ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNEE 1981 N° 79

HYPERBILIRUBINEMIE CONSÉQUENCES RÉNALES CHEZ LE RAT GUNN

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
DIPLÔME D'ÉTAT

présentée et soutenue publiquement en 1981
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

Patrick, Marcel, Joseph LE MASLE
Né le 11 Août 1954 à IVRY-SUR-SEINE (Val-de-Marne)

Jury :

Président : M. GUILHEM
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs :
M. VAN HAVERBEKE
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
M. CABANIE
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Association des Élèves
E.N.V.T.

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNÉE 1981 N° 79

HYPERBILIRUBINEMIE CONSÉQUENCES RÉNALES CHEZ LE RAT GUNN

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
DIPLÔME D'ÉTAT

présentée et soutenue publiquement en 1981
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

Patrick, Marcel, Joseph LE MASLE
Né le 11 Août 1954 à IVRY-SUR-SEINE (Val-de-Marne)

Jury :

Président : M. GUILHEM
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs : M. VAN HAVERBEKE
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. CABANIE
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Association des Elèves
E. N. V. T.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. LAUTIE
Directeur honoraire ..... M. FLORIO
Professeurs Honoraires ..... M. BRIZARD
M. BERTHELON
M. SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Professeur sans chaire ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... M. RICO
Professeur sans chaire ..... M. BRAUN
Maître-Assistant ..... M. BENARD

Physique biologique et médicale
Chimie Biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX
Maître-Assistant ..... M. LIGNEREUX
Maître-Assistant ..... M. SAUTET

Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... M. FARGEAS
Maître-Assistant Agrégé ..... M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie et Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique

CHAIRE D'HYGIENE ET D'INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître-de Conférences ..... M. EECHKOUTTE
Maître-Assistant agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie
des Denrées alimentaires d'Origine Animale

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... M. DORCHIES
Maître de Conférences ..... M. FRANC
Maître-Assistant ..... M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES

Professeur titulaire ..... M. LESCURE
Maître de Conférences ..... M. GUELFI
Maître-Assistant ..... M. REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences ..... M. BEZILLE
Maître-Assistant ..... M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail
et des Animaux de Basse-Cour - Clinique
Clinique ambulatoire

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX
Maître-Assistant Agrégé ..... M. GENEVOIS
Maître-Assistant ..... M. AUTEFAGE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale
Technique Chirurgicale - Pathologie
Chirurgicale - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... M. FERNEY
Professeur sans chaire ..... M. ROYAL
Maître-Assistant Agrégé ..... M. TAINTURIER

Sémiologie et Propédeutique - Pathologie
de la Reproduction - Obstétrique - Clinique

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... M. CHANTAL
Maître de Conférences ..... M. GANIERE
Maître-Assistant ..... M. PICAVET

Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître-Assistant ..... M. PELLERIN

Microbiologie - Immunologie
Pathologie Générale

CHAIRE DE ZOOTECHNIE ET ECONOMIE RURALE

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... M. DARRE
Maître-Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique appliquée
Hygiène Générale - Zootechnie - Elevage
Economie Générale et des Productions Animales

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Professeur sans chaire ..... M. GRIESS

Botanique appliquée et bromatologie
Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. Les Professeurs ANGELIER, ARMENGAUD, AUVERGNAT, BLANC, BOURBON, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET, LE BIHAN, MAZENC, RIVES

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables
des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en
date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A TOUS CEUX QUI M'ONT AIDE DANS L'ELABORATION DE CETTE THESE.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur GUILHEM
de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait le très grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

-:-:-

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur VAN HAVERBEKE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Nous ne souhaitons qu'une seule chose : avoir le plaisir de travailler avec vous pendant très longtemps encore.

Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

-:-:-

Monsieur le Professeur CABANIE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vous nous avez souvent aidé par vos conseils judicieux, votre amabilité et votre dynamisme.

Veuillez accepter le témoignage de notre profonde reconnaissance.

PLAN

Introduction.

Chapitre premier : METABOLISME DE LA BILIRUBINE.

I. Etude générale.

1°- Origines de la bilirubine.

2°- Synthèse et transport sanguin.

a. Synthèse.
b. Transport sanguin.

3°- Métabolisme intrahépatique.

a. Transfert.
b. Conjugaison.

4°- Métabolisme des pigments biliaires.

5°- Métabolisme extra-hépatique.

a. Muqueuse intestinale
b. Rein.

II. Rôle particulier du rein dans le métabolisme de la bilirubine.

1°- Dégradation rénale de l'hémoglobine.

a. Filtration et réabsorption de l'hémoglobine par le rein.
b. Dégradation rénale de l'hémoglobine.
c. Conversion enzymatique de l'hème hémoglobinique en bilirubine par le rein.
d. Rapprochement entre les observations expérimentales et les cas clinicopathologiques.

2°- Métabolisme rénal de la bilirubine.

a. Mise en évidence d'une activité de filtration, réabsorption et sécrétion de la bilirubine par le rein.
b. Mise en évidence d'une activité glucuronyltransférase du rein.

Chapitre deuxième : PATHOLOGIE LIEE A LA BILIRUBINE.

I. Toxicité de la bilirubine.

1°- Bilirubine conjuguée.

2°- Bilirubine non conjuguée.

II. Les hyperbilirubinémies héréditaires.

1°- Fixation hépatique de la bilirubine.

a. Eczéma du mouton Southdown.
b. Syndrome de Gilbert.

2°- Conjugaison de la bilirubine.

a. Le rat Gunn.
b. Syndrome de Crigler et Najjar.
c. Ictère de l'enfant nourri au sein.
d. Hyperbilirubinémie néonatale familiale transitoire.

3°- Excrétion hépatique de la bilirubine.

III. Le rat Gunn.

1°- Etude générale - Intérêt.

a. Définition.
b. Historique.
c. Elevage du rat Gunn.
d. Pathologie spontanée.
e. Intérêt du rat Gunn pour le chercheur.

2°- Pathologie rénale spontanée du rat Gunn.

a. Physiopathologie : le défaut de concentration urinaire du rat Gunn.
b. Etude anatomo-pathologique du rein de rat Gunn.

1/ Etude autoradiographique.
2/ Histologie classique.
3/ Microscopie électronique.
4/ Corrélation entre les altérations fonctionnelles et morphologiques.

Conclusion.

Bibliographie.

INTRODUCTION

La bilirubine est un déchet du métabolisme général de l'organisme, dont l'élimination dans la bile nécessite auparavant une glucuronoconjugaison, dans le foie principalement. Lorsque ce pigment ne peut être éliminé pour une cause quelconque, l'hyperbilirubinémie résultante est à l'origine de troubles souvent graves.

Le défaut de métabolisme de la bilirubine peut être dû à différents facteurs, en particulier génétiques. C'est le cas du rat Gunn, un mutant du rat Wistar, qui présente une hyperbilirubinémie non conjuguée, non hémolytique, chronique et héréditaire, liée à un gène autosomal récessif induisant une déficience en enzyme de la glucuronoconjugaison. Cette particularité lui confère une pathologie spontanée étroitement liée à l'intoxication par la bilirubine, pathologie qui présente un grand intérêt en recherche expérimentale et en pathologie comparée.

L'objet de la présente étude concerne, dans un premier temps, le métabolisme de la bilirubine, avec un chapitre particulier consacré au métabolisme extrahépatique et plus précisément au rôle joué par le rein dans certaines conditions pathologiques.

Nous nous intéresserons dans un deuxième temps au pouvoir toxique de la bilirubine conjuguée et non conjuguée, puis nous passerons en revue les divers défauts héréditaires touchant le métabolisme de la bilirubine. L'exemple du rat Gunn, illustrant parfaitement ces hyperbilirubinémies constitutionnelles, nous retiendra plus longtemps du fait de son intérêt en médecine comparée, ainsi que pour le physiologiste et le toxicologue.

Nous terminerons enfin par une étude physiopathologique et surtout anatomopathologique du rein du rat Gunn, puisque cet organe est spécialement intéressé par les effets toxiques de l'hyperbilirubinémie.

Chapitre premier

METABOLISME DE LA BILIRUBINE

-:-:-:-

I. ETUDE GENERALE

1°- Origines de la bilirubine.

a. Définition.

La bilirubine est un composé organique de formule chimique $C_{33}\ H_{36}\ O_6\ N_4$ que l'on trouve physiologiquement dans le sang circulant, le foie et la bile.

b. Origine.

La bilirubine a trois origines :

- pour la plus grande part (80-90 %), elle provient de la dégradation de l'hémoglobine sanguine par les cellules du système réticulo-endothélial de la moelle osseuse, du foie et surtout de la rate. L'hémoglobine provient elle-même de la destruction des érythrocytes sénescents au terme de leur vie normale dont la durée est de 4 mois environ ;

- pour 10 à 20 %, elle est élaborée dans la moelle osseuse par dégradation intra-médullaire d'érythrocytes immatures ou bien par dégradation de l'hème formée en trop grande quantité par rapport à la globine existante ;

- une dernière voie de formation semble être un anabolisme direct de la bilirubine sans passer par le stade hême, cette syn-

thèse s'effectuant probablement dans le foie.

Les deux dernières origines ont été mises en évidence chez l'homme par administration de glycine marquée (^{15}N) in vivo [39] : avant son délai d'incorporation dans les érythrocytes circulants (quelques jours), l'isotope est détecté dans la stercobiline et le produit de dégradation intestinale de la bilirubine. On ne le retrouve ensuite que 120 jours après environ, ce qui correspond à la survie moyenne des globules rouges circulants, formés lors de l'administration de l'isotope.

Le pic précoce suggère que la glycine est incorporée à la bilirubine par un mécanisme bien plus rapide que le cycle de synthèse -destruction des érythrocytes. La bilirubine marquée proviendrait de plusieurs sources fournissant l'hême, ou les porphyrines, non utilisées lors de la synthèse de l'hémoglobine, la dégradation intracorpusculaire de l'hémoglobine pendant la maturation des érythrocytes dans la moelle osseuse, la destruction des érythrocytes néoformés dans la moelle osseuse, la synthèse directe des pigments biliaires à partir de porphyrine sans dégradation du cycle porphyrine, et enfin le turn-over de protéines contenant un cycle non hémoglobinique.

Des études utilisant des précurseurs marqués au ^{14}C indiquent que la "fraction précoce" du pigment marqué est constituée de deux composants : un associé à l'érythropoïèse et l'autre d'origine primitive dans le foie [65].

Le taux de synthèse de la bilirubine "précoce" de source non érythropoïétique peut être estimé par mesure de l'incorporation d'acide δ-aminolévulinique (ALA) marqué dans la bilirubine biliaire. L'ALA radioactif est plus précocement incorporé dans le pigment

biliaire précoce que dans l'hème de l'hémoglobine. Des protéines contenant de l'hème non hémoglobinique telles que la myoglobine, la catalase, la tryptophane-pyrrolase et les cytochromes, ont été trouvées dans tous les tissus de l'organisme. Comme avec l'hémoglobine dérivée des érythrocytes, la dégradation de ces protéines permet une synthèse de bilirubine avec libération de monoxyde de carbone. Le foie contient ces protéines en quantité très importante et est probablement la plus grande source de bilirubine non érythrocytaire.

2° - Synthèse et transport sanguin.

a. Synthèse.

Rappelons tout d'abord que l'hémoglobine résulte de la combinaison d'une protéine, la globine, avec quatre molécules d'hème (complexe de protoporphyrine IX et de fer ferreux).

La formation de bilirubine peut se faire selon deux processus [103] intervenant dans le catabolisme de l'hémoglobine (cf. fig. n° 1):

- le plus souvent par oxydation de l'hémoglobine, sous l'action d'un complexe enzymatique : l'hème-oxygénase, ce qui conduit à la formation d'une combinaison globine + hématine (complexe assez stable constitué par l'oxydation de l'hème, de protoporphyrine IX et de fer ferrique). Les deux composants se séparent ensuite alors que les phénomènes d'oxydation se poursuivent ; il y a libération du fer et ouverture du cycle porphyrique entre les anneaux I et II, et élimination du carbone α-méthylénique sous forme de monoxyde de carbone.(Nous pouvons noter à ce propos que 80 % du CO expiré lors de la respiration provient du catabolisme des érythrocytes matures circulants. Donc il est possible d'utiliser le taux d'expiration du CO cliniquement comme index du catabolisme de l'hème [39]). On arrive à la formation de biliverdine (C_{33} H_{34} O_6 N_4) qui est le premier des pigments

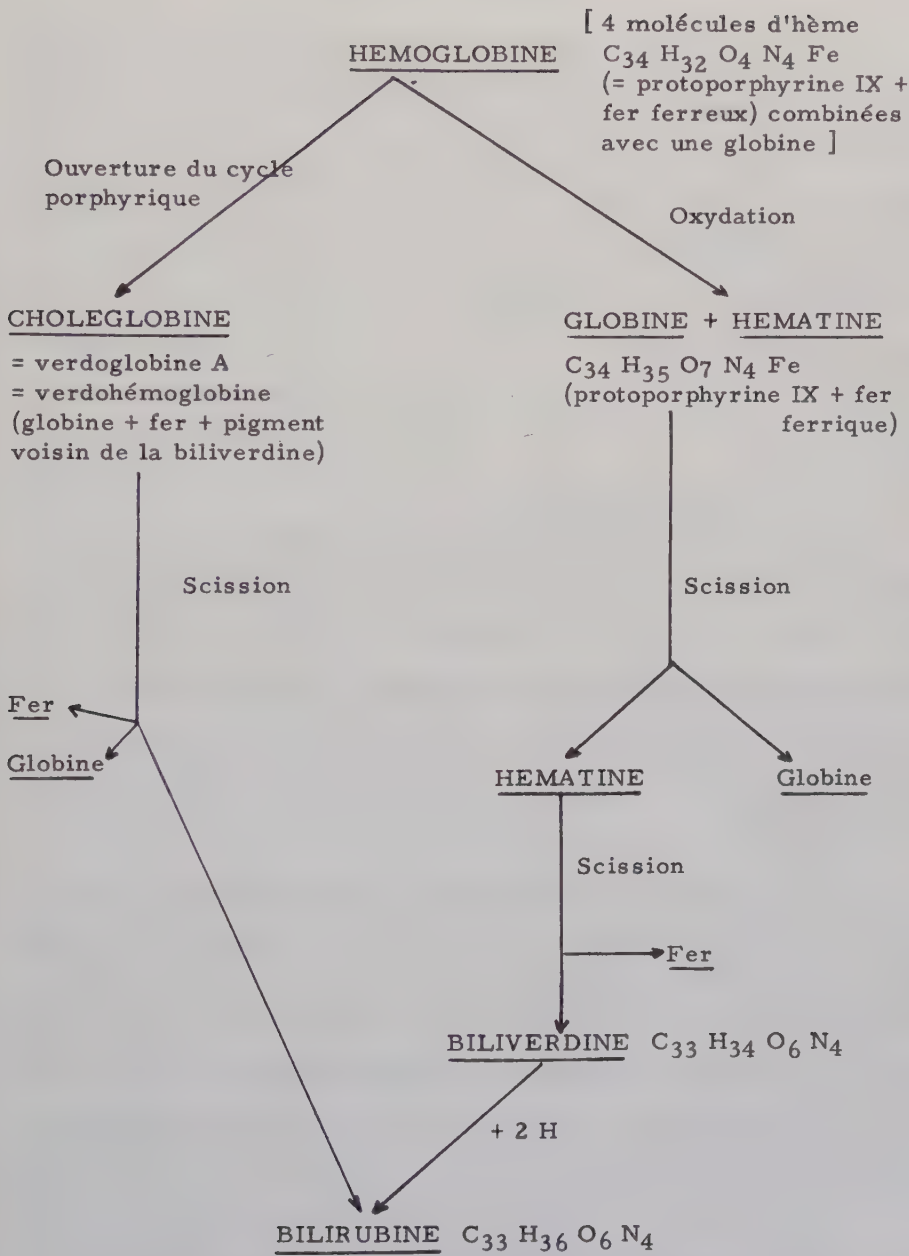

Fig. n°1 : Dégradation de l'hémoglobine en bilirubine (d'après TOULET J. & ALBOT G.) [103]

biliaires vrais. Cette biliverdine est, enfin, facilement réduite en bilirubine $C_{33}\ H_{36}\ O_6\ N_4$ par la biliverdine réductase :

- parfois, dans certains cas, le fer n'est pas libéré à l'ouverture du cycle porphyrique, de telle sorte qu'il est encore présent dans le produit intermédiaire ainsi formé, à savoir la choléglobine (ou verdoglobine A ou verdohémoglobine) dans laquelle le fer et un pigment biliaire proche de la biliverdine sont liés à la globine. Les phénomènes ultérieurs de scission et d'oxydation libèreront la globine et le fer et permettront d'aboutir directement à la bilirubine.

b. Transport sanguin.

La bilirubine formée se trouve toujours dans le sang sous forme non conjuguée, dite également "libre", bien que fixée sur l'albumine sérique. Elle est mise en évidence qualitativement par la réaction directe-lente de Hijmans Van Den Bergh, et peut être dosée par la réaction indirecte du même auteur [103]. Théoriquement, dans les conditions normales, toute la bilirubine plasmatique est sous forme conjuguée.

La bilirubine non conjuguée n'est pas hydrosoluble et ne peut donc être éliminée par le rein (sa solubilité dans l'eau est de 0,1 à 0,5 mg/100 ml à pH et pression osmotique physiologiques). Elle est, par contre, liposoluble et peut ainsi plus facilement franchir les membranes cellulaires, en particulier au niveau du système nerveux central chez le nouveau-né et spécialement des noyaux gris centraux où son accumulation provoque une grave encéphalopathie ou "Kernictère".

La bilirubine non conjuguée est transportée dans le sang en liaison avec l'albumine sérique qui augmente sa solubilité dans le plasma. Chez l'homme, chaque molécule d'albumine est capable de

fixer au moins deux molécules de bilirubine, permettant une concentration sérique maximale théorique chez l'adulte d'environ 8 mg/100 ml. La fixation de la première molécule de bilirubine sur l'albumine serait plus forte que la fixation de la deuxième molécule ; ainsi, il y aurait un gradient dans l'affinité de fixation dont résulterait une plus grande dissociabilité de la bilirubine d'avec les protéines plasmatiques lors d'une augmentation de sa concentration sérique.

Des études ont démontré d'autre part une fixation possible de petites quantités de bilirubine par des α_1 et α_2, et β_2 globulines plasmatiques quand la concentration sérique de bilirubine dépasse 20 ou 30 mg/100 ml ; mais la faible quantité relative de ces protéines dans le plasma ne semble leur conférer qu'un rôle mineur par rapport à la fixation sur l'albumine.

La concentration de bilirubine non conjuguée plasmatique est déterminée par les vitesses relatives auxquelles elle pénètre et quitte la circulation, par la concentration d'albumine sérique et par la disponibilité des sites de fixation sur l'albumine.

La concentration normale de bilirubine sanguine est de 0,5 à 1 mg/100 ml. Cependant, la limite supérieure de normalité est incertaine car la courbe de distribution des valeurs obtenues à partir d'adultes supposés normaux est assymétrique. Selon une analyse statistique sur une population importante, la limite supérieure de normalité chez l'homme est 1,5 mg/100 ml. Pour d'autres espèces comme le chien, le rat, le mouton, le plasma est virtuellement dénué de bilirubine ; en revanche, chez le cheval, la concentration de bilirubine plasmatique est considérablement supérieure à celle de l'homme [39].

La capacité de fixation de la bilirubine non conjuguée par l'albumine plasmatique peut être modifiée par un certain nombre d'agents physiques ou chimiques : des médicaments anioniques, tels que les sulfamides, sont captés par l'albumine et entrent en compétition avec la bilirubine pour les sites de fixation.

Par exemple, le sulfisoxazole administré à un enfant présentant une hyperbilirubinémie non conjuguée, provoque une diminution marquée de la concentration sérique en bilirubine ; la bilirubine est chassée de ses sites de fixation sur l'albumine et pénètre dans les tissus à forte teneur en lipides, ou bien cristallise en position extracellulaire dans des organes tels que le tractus gastrointestinal et le rein.

L'administration de sulfamides à une femme enceinte ou à des nouveaux-nés ictériques augmente de même le risque de kernictère chez les enfants.

Les acides gras libres se comportent également comme des compétiteurs de la bilirubine vis à vis de l'albumine.

L'asphyxie, l'hypoxie, l'acidose peuvent aussi augmenter le risque de kernictère chez le nouveau-né, probablement par interférence avec la fixation albumine-bilirubine bien qu'elles puissent, d'autre part, augmenter la perméabilité du cerveau à la bilirubine non conjuguée.

3° - Métabolisme intrahépatique.

La bilirubine non conjuguée est captée au niveau du foie par l'hépatocyte et est transférée jusqu'au réticulum endoplasmique de celui-ci où s'effectuent les mécanismes de conjugaison aboutissant à

la formation de bilirubine conjuguée ou "liée" (cf. fig. n°2).

a. Transfert.

Le foie paraît avoir une capacité sélective pour capter la bilirubine et d'autres anions organiques du plasma. Par exemple, après injection intraveineuse d'une dose de bilirubine radioactive à un rat, 65 % de cette dose se retrouvent dans le foie au bout de 5 minutes, et 85 % de cette fraction hépatique sont situés dans le surnageant du foie après centrifugation [39]. Les études sur hépatocytes isolés de rat [51] montrent qu'au bout de 60 secondes la concentration en bilirubine non conjuguée est 100 fois plus importante dans les hépatocytes que dans le milieu de survie où elle a été introduite. De plus, la vitesse initiale de captage est en relation linéaire avec la concentration de bilirubine dans le milieu.

Les mécanismes du transfert rapide et de la sélectivité hépatique sont peu connus et deux théories ont cours : la relative spécificité de l'hépatocyte à transférer la bilirubine non conjuguée à partir du plasma résiderait théoriquement dans la membrane plasmique bordant les sinus sanguins, ou bien dans des protéines cytoplasmiques ayant une affinité pour la bilirubine non conjuguée et les autres anions organiques.

La membrane plasmique bordant les sinus hépatiques pourrait tirer une propriété fonctionnelle unique de sa composition moléculaire qui diffère de celle des membranes des autres cellules ainsi que des autres portions de membrane de l'hépatocyte.

L'isolement de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes par centrifugation différentielle a permis l'étude de leur composition en lipides et acides gras ; celle-ci se révèle semblable à celle des mem-

branes cellulaires des autres tissus ; cependant la cytochimie a montré une hétérogénéité dans l'activité enzymatique des différentes portions de la membrane plasmique de l'hépatocyte.

Les membranes plasmiques du foie de rat fixent la sulfobromophtaléine (BSP) et d'autres anions organiques in vitro. Les anions organiques tels que le taurocholate, la bilirubine non conjuguée et la fluorescéine, qui ne sont pas en compétition avec la BSP dans la fixation hépatique in vivo, ne provoquent pas d'interférence dans sa fixation par les membranes plasmiques in vitro. En revanche, d'autres anions organiques tels que le vert indocyanine et l'acide flavaspidique, qui entrent en compétition avec la BSP in vivo, réduisent considérablement sa fixation par les membranes plasmiques in vitro.

Ces observations montrent que la membrane cytoplasmique de l'hépatocyte n'est pas homogène du point de vue moléculaire et que les sites récepteurs pour les divers anions organiques peuvent être localisés dans les portions de membranes plasmique bordant les sinusoïdes.

Une autre théorie suppose un passage passif de la bilirubine non conjuguée au travers de la membrane cytoplasmique après qu'elle se soit dissociée de l'albumine ; ceci lui rend une structure non pôlaire à laquelle la membrane est perméable. En effet, des inhibiteurs métaboliques variés, qui devraient réduire une éventuelle fixation active, sont sans action sur le captage de la bilirubine non conjuguée [51].

Après la diffusion passive, deux protéines cytoplasmiques, désignées par Y et Z, joueraient le rôle d'accepteur et faciliteraient le transfert de la bilirubine dans l'hépatocyte. Y et Z ont été isolées et partiellement caractérisées chimiquement et physiologiquement :

Y est une protéine basique qui fixe plus de bilirubine et de BSP que Z ; cette dernière étant également une protéine basique, qui fixe ces substances lorsque leurs concentrations par rapport à Y atteignent un taux critique. Y et Z ont été trouvées dans le foie de toutes les espèces de mammifères étudiées. On suppose que Y et Z peuvent entretenir la circulation d'anions organiques entre le plasma et le foie. Des substances telles que l'acide flavaspidique, qui provoquent régulièrement une rétention de bilirubine non conjuguée et de BSP chez l'homme et les animaux, interfèrent avec la fixation de bilirubine et de BSP par Z mais pas par Y. Le rôle de ces protéines plasmatiques dans les divers états caractérisés par une hyperbilirubinémie non conjuguée reste à déterminer.

b. Conjugaison.

1/ La glucuronyl-transférase.

Le transfert et la conjugaison de la bilirubine non conjuguée dépendent, pour leur plus grande part, de la présence et de l'activité d'une enzyme : la glucuronyl-transférase, la radical glucuronyl étant fourni par l'acide uridine-diphosphate-glucuronique.

Cette enzyme catalyse le transfert d'acide glucuronique à partir d'acide uridine-diphosphate (UDP) sur des récepteurs variés phénoliques, carboxyliques et aminés. Les substrats de cette enzyme sont des stéroïdes (comme la tétrahydrocortisone), la métanéphrine, des médicaments (chloramphénicol, salicylates, sulfonamides), des produits chimiques (menthol) et enfin des pigments biliaires (la bilirubine).

La bilirubine constitue le substrat endogène le plus important pour l'enzyme ; elle forme un glucuronide carboxylique (ester), et sa biosynthèse s'effectue par la voie glucuronide :

- Glucose + ATP $\xleftarrow{\text{hexokinase}}$ glucose - 6 - P ;

- Glucose - 6 - P $\xleftarrow{\text{phosphoglucomutase}}$ glucose - 1 - P ;

- Glucose - 1 - P + UTP $\xleftarrow[\text{pyrophosphorylase}]{\text{UDPG}}$ UDPG + PP ;

- UDPG + 2 NAD $\xleftarrow[\text{deshydrogénase}]{\text{UDPG}}$ UDPGA + 2 NADH + $2H^+$

- UDPGA + bilirubine $\xrightarrow[\text{transférase}]{\text{glucuronyl}}$ bilirubine glucuronide + UDP.

Dans ce système, le glucose sert de source d'acide glucuronique et ce mécanisme représente la voie la plus importante, sinon exclusive, de formation du glucuronide chez l'homme.

La réaction catalysée par le glucuronyl-transférase paraît être le facteur limitant dans le schéma général.

La glucuronyl-transférase est située dans les microsomes hépatocytaires. On peut trouver également une activité glucuronyl-transférase dans d'autres tissus de l'organisme : muqueuse intestinale, rein, peau, ovaires, surrénale, testicule et membrane synoviale. Cependant l'activité la plus importante réside dans le foie où elle est associée aux membranes du reticulum endoplasmique des hépatocytes.

L'activité glucuronyl-transférase est relativement instable et l'enzyme a été partiellement purifiée mais non isolée ni caractérisée. En somme, on n'est pas certain qu'il existe une ou plusieurs enzymes. Les nombreuses expériences entreprises [39] apportent des résultats compatibles avec une multiplicité des glucuronyl-transférases, ou mieux une affinité variable d'une seule enzyme pour différents substrats.

Enfin, des études plus récentes [18] font intervenir deux enzymes dans la conjugaison de la bilirubine :

- l'uridine diphosphate glucuronate glucuronyltransférase (E. C. 2. 4. 1. 17), une enzyme microsomale qui catalyse la formation de bilirubine-monoglucuronide à partir de bilirubine non conjuguée et d'acide UDP glucuronique ;

- la bilirubine glucuronoside glucuronyl-transférase (E. C. 2. 4. 1. 95), une enzyme concentrée dans les membranes plasmiques qui catalyse la transglucuronidation de deux molécules de bilirubine monoglucuronide en une molécule de bilirubine diglucuronide et une molécule de bilirubine conjuguée.

Il a été démontré que le potentiel maximal d'activité de l'enzyme est limité par les phospholipides de la membrane microsomale [1]. Des études cinétiques ont suggéré que cette inhibition permettrait d'adapter de façon optimale l'activité enzymatique aux conditions rencontrées in vivo.

2/ Facteurs intervenant sur l'activité glucuronyl-transférase hépatique.

De nombreux facteurs ont une influence sur la présence ou l'activité de l'enzyme hépatique ; ils sont d'origine endogène (déficience génétique, âge du sujet, trouble métabolique) ou bien exogène (substances diverses).

α Déficience génétique en glucuronyl-transférase.

Les sujets de l'espèce humaine présentant le syndrôme de Crigler-Najjar, ainsi que les rats appartenant à une lignée mutante du rat Wistar (Gunn 1938), présentent une déficience génétique en enzyme glucuronyl-transférase. Cette anomalie a des conséquences

pathologiques graves que nous étudierons en détails dans un chapitre ultérieur.

z Age du sujet : notion de maturation enzymatique.

Une maturation tardive de la glucuronyl-transférase a été rendue responsable de l'apparition d'une hyperbilirubinémie non conjuguée transitoire, ou "jaunisse physiologique" qui se produit chez presque tous les nouveaux-nés humains [39]. De nombreuses études ont été entreprises sur des animaux ne manifestant pas d'hyperbilirubinémie néonatale, et en particulier le rat [100] : l'activité spécifique des microsomes hépatiques des rats normaux atteint le niveau adulte vers le 4e jour de la vie ; par contre, quand les valeurs sont calculées par gramme de foie, l'augmentation de l'activité est plus graduelle. Cette différence peut être expliquée en considérant l'augmentation de l'activité spécifique des microsomes pendant les quatre premiers jours comme une maturation, et l'augmentation subséquente de l'activité enzymatique par unité de poids de foie comme une accumulation de microsomes par l'hépatocyte, sans changement dans la composition protéique du réticulum endoplasmique support de la transférase. La "maturation" de l'activité enzymatique totale du foie correspond donc à la somme : maturation enzymatique + croissance.

Cependant, on a démontré [39] que le mode et la vitesse de développement de l'activité glucuronyl-transférase variaient selon les espèces animales étudiées et selon le substrat utilisé comme récepteur de glucuronide. En conséquence, le rôle de la glucuronyl-transférase dans la "jaunisse physiologique" du nouveau-né n'a pas été définitivement établi.

Une autre théorie fait appel à une augmentation de la production

de bilirubine résultant d'une diminution de la durée de vie des érythrocytes chez les nouveaux-nés, d'une inhibition de la glucuronyl-transférase par les stéroïdes d'origine fœtale ou placentaire et d'une diminution du transfert de la bilirubine du plasma vers la cellule hépatique. Une fixation hépatique faible de la bilirubine a été démontrée chez le cochon d'Inde âgé de moins de deux semaines, ainsi que chez le rat de moins de 30 jours [44]. Dans le foie fœtal de rat, l'activité de fixation de la bilirubine et de la bromosulfophtaléïne (BSP) a une valeur égale à 25-35 % de celle de l'adulte. Par contre, la faible activité de fixation décelée dans le cerveau, le rein, la rate et le muscle (1/10 de l'activité hépatique) n'évolue pas avec la croissance de l'animal.

Inhibition et stimulation de l'activité glucuronyl-transférase.

L'activité glucuronyl-transférase est inhibée in vitro par divers médicaments, colorants et stéroïdes, dont certains (tels que la novobiocine et le prégnane-3α , 20β -diol) provoquent une hyperbilirubinémie non conjuguée non hémolytique prolongée chez le nouveau né. Le prégnane-3α , 20β -diol est excrété par la glande mammaire de certaines mères allaitantes [92]. Les enfants ingérant le lait manifestent ce type de syndrôme, bénin, entre la 3e et la 12e semaine de vie ; si l'alimentation au sein est interrompue, l'hyperbilirubinémie disparaît en 3 à 12 jours. Ces mères sécrètent l'isomère anormal du prégnandiol dans leur urine pendant la lactation et sont cliniquement normales. On pense qu'elles présenteraient une déficience héréditaire dans le métabolisme des stéroïdes.

D'autres mères présentent dans leur sérum, pendant le dernier trimestre de grossesse, un stéroïde progestéronique non identifié qui inhibe également l'activité glucuronyl-transférase du nouveau-

né. Ce facteur disparaissant du sérum de la mère et de l'enfant rapidement après la délivrance, est responsable de l'hyperbilirubinémie familiale néonatale transitoire ou syndrôme de Lucey-Driscoll [7].

L'activité glucuronyl-transférase hépatique est d'autre part stimulée par l'administration de benzopyrène, de chlorcyclizine, d'aminoquinoléine et de phénobarbital chez les animaux adultes et nouveaux-nés. Ces substances provoquent une prolifération du réticulum endoplasmique lisse et une augmentation de la synthèse des protéines microsomales comprenant une catégorie de TPNH oxydative.

La bilirubine elle-même possède la propriété de stimuler l'activité glucuronyl-transférase [94, 93]. Son action est semblable à celle de détergents tels que le désoxycholate (activateur bien connu de l'activité UDPGT). A concentrations équimolaires, la bilirubine est 50 % plus efficace que le désoxycholate.

Dans les expériences de shunt porto-cave chez le rat [78, 77], on a observé une diminution de l'excrétion de bilirubine, due à la modification circulatoire, mais également pour une part plus importante à une réduction de l'activité enzymatique elle-même. Notons que l'administration de phénobarbital rétablit en 20 jours les valeurs normales de l'excrétion de la bilirubine et de l'activité UDP glucuronyl-transférase.

La castration, enfin, détermine chez les rats des deux sexes une hypersécrétion biliaire ne disparaissant qu'au bout de 3 mois, après un pic à 2 mois [98]. Cependant, la bile de ces animaux contient des concentrations de sels biliaires et de bilirubine 28,7 % et 24 % inférieures, respectivement, à celles des rats témoins.

3/ Mécanisme de la conjugaison.

La conversion de la bilirubine en un conjugué plus pôlaire est essentielle pour son excrétion biliaire. Nous avons vu que deux enzymes interviennent dans cette conjugaison qui s'opère en deux étapes :

- 1 molécule de bilirubine non conjuguée $\xrightarrow{\text{conjugaison}}$ 1 molécule de bilirubine monoglucuronide ;

- 2 molécules de bilirubine monoglucuronide $\xrightarrow{\text{transglucuronidation}}$ 1 mol. de bilirubine diglucuronide + 1 mol. de bilirubine non conjuguée.

La conjugaison de la bilirubine se produit au niveau cytoplasmique de l'hépatocyte, alors que la transglucuronidation, elle, a lieu au niveau de la membrane du pôle biliaire, comme l'ont montré les expériences de centrifugation suivies d'une mesure zonale de l'activité enzymatique : cette activité est 3 fois plus forte que dans les autres fractions de membrane plasmique [18, 52].

La bilirubine peut être excrétée sous forme mono ou diconjuguée. Mais selon les espèces, l'un ou l'autre conjugué peut être plus électivement éliminé par le foie. Chez l'homme, le chien, le chat et le rat, la bilirubine est excrétée dans la bile en grande partie sous forme diconjuguée ; tandis que dans d'autres espèces étudiées [33] (cobaye, lapin, souris, porc, bœuf, mouton, poulet) la forme monoconjuguée est prépondérante.

La formation de monoglucuronide et sa conversion en diglucuronide dépendent de la présence d'acide UDP glucuronique. Les deux réactions sont stimulées par un prétraitement des animaux au phénobarbital [14].

Lorsque, in vivo, se produit un excès d'apport de bilirubine au

foie, ou bien lorsque l'animal présente une déficience en activité UDP glucuronyl-transférase, on peut observer que la bile excrétée contient plus de monoglucuronide et moins de diglucuronide en proportions.

Remarque : certains auteurs [76] ont parlé d'une "déconjugaison" du glucuronide de bilirubine par le foie. Pour eux, une partie du glucuronide formé serait ensuite hydrolysée dans le foie lui-même, avant d'être excrétée dans la bile. La présence d'une forte concentration de β-glucuronidase dans cet organe peut confirmer cette hypothèse. Mais d'un autre côté, en se fondant sur les connaissances récentes concernant le mécanisme de la conjugaison de la bilirubine, il semble plus vraisemblable que la bilirubine non conjuguée trouvée dans la bile provienne plutôt du bilan de la réaction de transglucuronidation.

4/ Autres types de conjugaison.

La glucuronoconjugaison de la bilirubine représente la voie principale de son métabolisme, mais elle n'est pas unique : 10 à 20 % de la bilirubine peuvent être transformés par sulfoconjugaison au niveau du foie [103] (cf. fig. n°2). De même, la bilirubine n'est pas seulement conjuguée avec l'acide glucuronique, mais également avec le glucose et le xylose ; plusieurs autres conjugués ont été décrits mais tous n'ont pas été identifiés.

Ces conjugués non glucuronides sont augmentés lors de rétention biliaire. Dans la bile de l'homme normal et dans le sérum et dans l'urine des malades présentant un ictère post-hépatique, les conjugués xylosés de la bilirubine atteignent 2 % et les glucosés 6 % [32]. Par contre, aucun changement significatif n'est signalé lors de maladies hépatiques. Le bilirubine-xyloside est absent de la bile du rat, mais existe dans la bile du chien, du lapin et du poulet (plus de 10 %) ; le

chien présente plus de 30 % de conjugués glucosés, le rat et le porc seulement 2 % et les autres espèces ont des valeurs intermédiaires. l'importance relative des transfers glucuronique, glucosique et xylosique est remarquablement constante, avec des rapports de 1 - 0,4 - 0,4 respectivement chez l'homme et 1 - 0,3 - 0,45 chez le rat.

Bien que l'activité UDP-xylosyl-transférase soit très importante dans le foie humain et de rat in vitro, les bilirubine - xylosides ne sont pas formés par le foie de rat sans addition préalable de sucre UDP, et ces conjugués sont quantitativement peu importants dans la plupart des échantillons de bile examinés. Ce processus de conjugaison peut être considéré comme un reste d'évolution, étant plus développé chez les plantes [32].

4° - Métabolisme des pigments biliaires.

La bilirubine conjuguée n'est pas liposoluble : elle est, donc, peu toxique pour les cellules nerveuses. Par contre, elle est hydrosoluble et peut être éliminée par le rein.

Après conjugaison, la bilirubine est rapidement excrétée par les hépatocytes. Elle traverse la membrane cellulaire au pôle biliaire sous l'action d'un processus actif d'excrétion dont la qualité dépend d'un certain nombre d'organites, lysosomes et appareil de Golgi en particulier. La membrane plasmique semble convenir anatomiquement à cette excrétion, car sa surface est augmentée par la présence de microvillosités ; d'autre part on y trouve également des phosphatases.

On pense que l'excrétion de bilirubine conjuguée est le facteur limitant dans le transit normal de la bilirubine du sang vers la bile.

Chez les animaux, les capacités à excréter la bilirubine augmentent avec l'âge pendant la période néonatale. Chez les rats adultes, le taux d'excrétion maximal est de 60 µg de bilirubine par 100 g de foie et par minute ; des données comparables ne sont pas connues chez l'homme, mais les observations cliniques suggèrent qu'il existe une réserve fonctionnelle importante avant que les possibilités d'excrétion hépatique soient dépassées. Ceci explique probablement le fait qu'une hémolyse sévère chez des patients présentant un fonctionnement hépatique normal se manifeste par une modeste hyperbilirubinémie conjuguée, alors que la même hémolyse chez des patients présentant des lésions hépatiques coexistantes est associée à une hyperbilirubinémie conjuguée importante.

La bilirubine conjuguée est l'un des nombreux anions organiques trouvés dans la bile. Pour certains auteurs, il y aurait une compétition entre ces anions du point de vue de l'excrétion dont le mécanisme serait unique pour tous. Pour d'autres auteurs, il y aurait une multiplicité des mécanismes d'excrétion hépatique et donc pas de compétition entre les anions.

Des substances variées, telles que les stéroïdes anabolisants C 17-alkylés, les œstrogènes et les contraceptifs oraux, réduisent régulièrement l'aptitude du foie à excréter les anions organiques. Mais l'hyperbilirubinémie ne survient que s'il y a au préalable une réduction de la capacité d'excrétion provoquée par une lésion du foie, ou bien une déficience héréditaire dans la fonction excrétrice du foie (syndrôme de Dublin-Johnson chez l'homme et le mouton).

La bilirubine conjuguée, excrétée par l'hépatocyte, chemine par les canalicules puis les canaux biliaires et gagne l'intestin, soit

après une phase de stockage dans la plupart des espèces, soit directement chez certains animaux dépourvus de vésicule biliaire, tels que le rat.

Elle fait partie de la bile sous forme de pigment biliaire, et va subir un nouveau métabolisme avant son élimination finale hors de l'organisme (cf. fig. n°2 et n°3).

Dans l'intestin grêle, une petite partie de la bilirubine conjuguée peut se transformer, par hydrolyse sous l'action des glucuronidases bactériennes, en bilirubine libre dont une fraction plus ou moins importante, liposoluble, peut traverser la paroi intestinale et être réabsorbée dans la circulation porte pour suivre le cycle entéro-hépatique, tandis que la bilirubine conjuguée, non liposoluble, traverse mal la paroi intestinale et reste en grande partie dans l'intestin grêle après son excrétion biliaire.

Les deux types de bilirubines subissent aussi, sous l'action des bactéries intestinales, des transformations successives par hydrolyse, réduction ou oxydation (cf. fig. n°3).

Normalement, la réduction de la bilirubine dans l'intestin donne naissance à la mésobilirubine (C_{33} H_{40} O_6 N_4), composé contenant 4 atomes additionnels d'hydrogène, puis au mésobilirubinogène ou urobilinogène IX (C_{33} H_{44} O_6 N_4) par réduction plus poussée.

Une partie de ce pigment intermédiaire est réabsorbée par la muqueuse intestinale sous forme d'urobilinogène sanguin. Elle participe au cycle entérohépatique pour être captée par le foie et y redonner de la bilirubine, tandis qu'une faible proportion est éliminée dans les urines où elle s'oxyde au contact de l'air pour donner de l'urobiline (C_{33} H_{40} O_6 N_4).

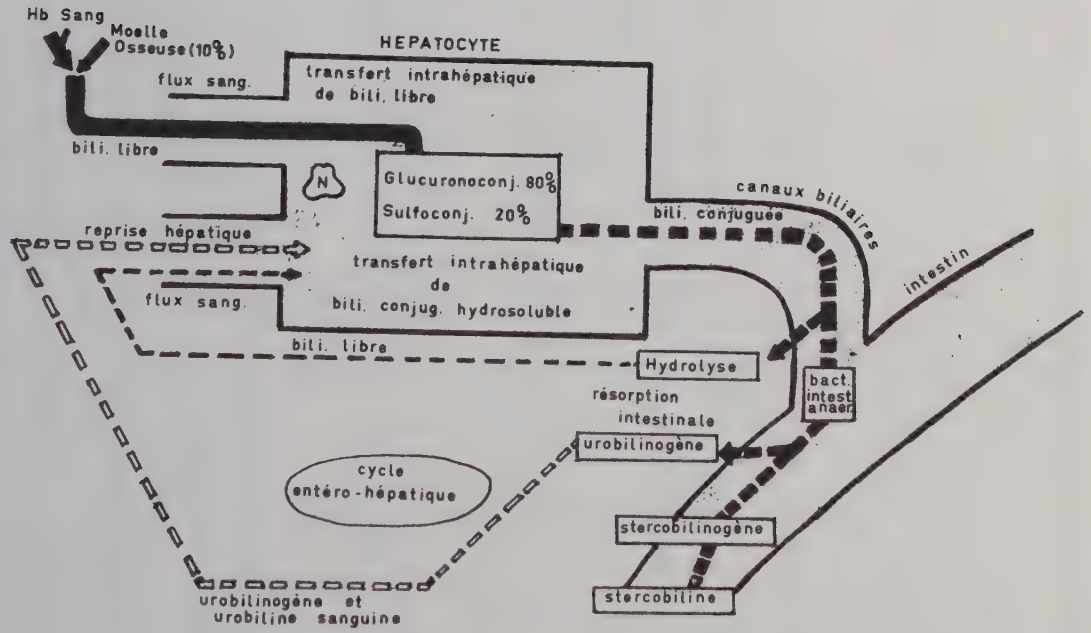

Fig. n° 2 : Métabolisme des pigments biliaires : cycle bilirubinémique (d'après ALBOT & TOULET) [103].

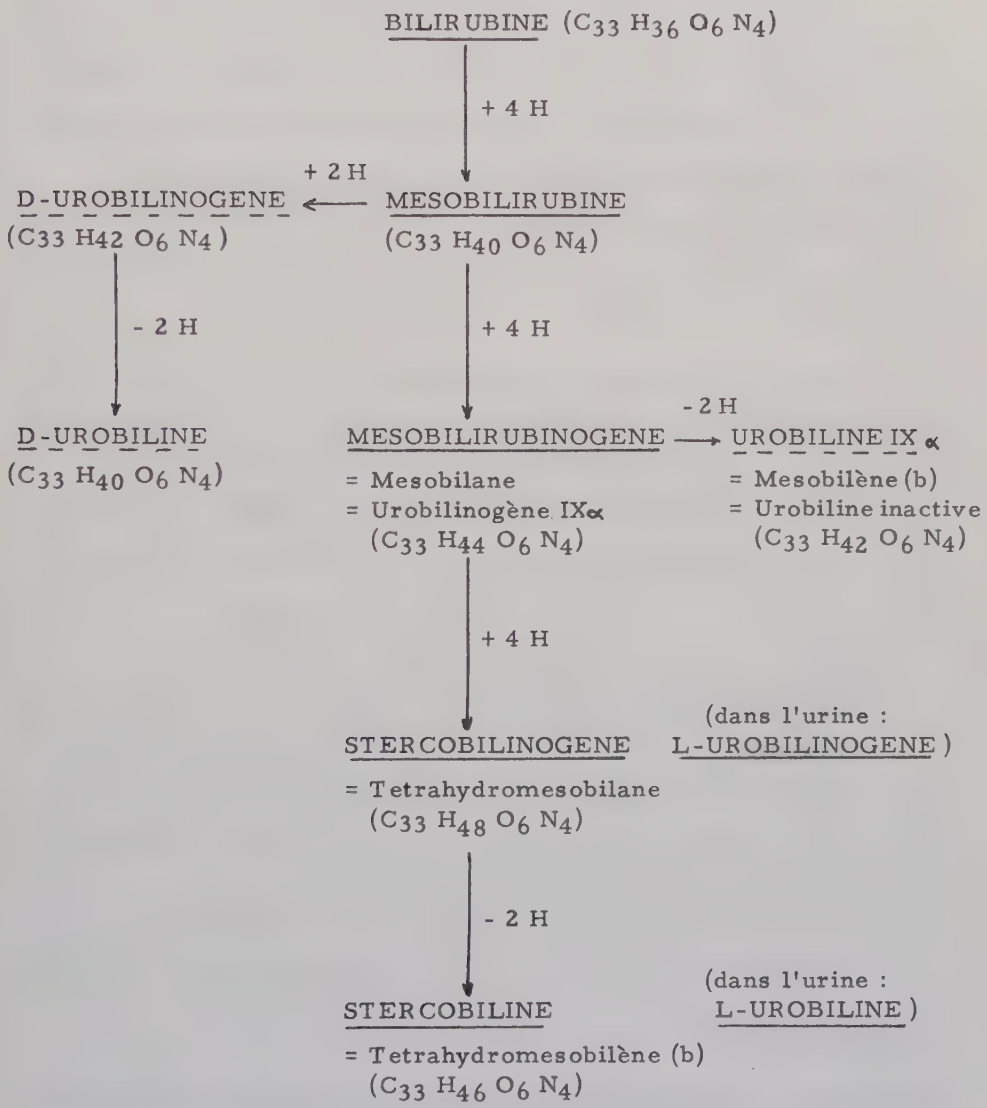

Fig. n° 3 : Métabolisme des pigments biliaires
(d'après TOULET J. & ALBOT G.) [103].

La plus grande partie du mésobilirubinogène est soumise à une nouvelle réduction, pour aboutir au stercobilinogène (C_{33} H_{48} O_6 N_4) (aussi appelé L-urobilinogène lorsqu'il est réabsorbé par la paroi intestinale et éliminé dans les urines). L'auto-oxydation des selles transforme le stercobilinogène, produit incolore, en stercobiline (C_{33} H_{46} O_6 N_4), pigment rouge-brun qui donne la couleur normale des fécès. Un produit identique peut être retrouvé dans les urines par oxydation du L-urobilinogène : on l'appelle L-urobiline.

Enfin, beaucoup plus accessoirement, dès le stade de formation de la mésobilirubine, une partie de ce pigment peut être réabsorbée par la paroi intestinale et réduite en urobilinogène dextrogyre (C_{33} H_{42} O_6 N_4) par addition de 2 atomes d'hydrogène. Ce dernier produit, oxydé dans les urines au contact de l'air, aboutit à l'urobiline destrogyre.

5° - Métabolisme extra-hépatique.

Le foie n'est pas le seul organe doué d'un pouvoir métabolisant pour la bilirubine, nous avons vu que le cerveau, le rein, la rate, le muscle du rat adulte peuvent fixer la bilirubine, cette activité étant 10 fois moins importante que dans le foie [44].
Nous avons vu également qu'une activité glucuronyl-transférase avait été détectée dans l'ovaire, la peau, la surrénale, le testicule, la membrane synoviale et surtout la muqueuse de l'intestin grêle et le rein [39].
Du point de vue enzymatique, l'enzyme de conjugaison (UDP glucuronate glucuronyl-transférase) est retrouvée en quantité appréciable dans le foie, la muqueuse de l'intestin grêle et le cortex rénal ; l'activité de transglucuronidation, elle, est présente dans le foie et le cortex rénal.

Notons enfin que l'activité glucuronyl-transférase du rein, limitée au cortex, n'a été décelée que chez le rat et le chien, les études sur l'homme et d'autres espèces animales ayant fourni des résultats négatifs [33].

Les principales voies extra-hépatiques de métabolisme de la bilirubine sont représentées par la muqueuse intestinale et le cortex rénal. Nous passerons rapidement sur la première éventualité, bien qu'elle ne soit pas négligeable, pour étudier la seconde plus en détails. c'est lorsque la fonction hépatique est altérée, que ces tissus peuvent assurer pour une petite part, la transformation de la bilirubine non conjuguée. Notons que, au moins chez le rat, le principal pigment formé par conjugaison extra-hépatique est le monoglucuronide de la bilirubine.

a. Muqueuse intestinale.

La bilirubine non conjuguée peut traverser la paroi de l'intestin grêle dans les deux sens [19]. L'incubation in vitro de jéjunum de rat avec ce pigment montre que le tissu le fixe et l'incorpore à un taux constant qui peut être augmenté par le taurocholate de sodium, ou bien diminué par la biliverdine (structure semblable : inhibition de la fixation par compétition ?). Le mécanisme de fixation de la bilirubine ne correspond donc pas à une simple diffusion de celle-ci à travers la paroi intestinale [20].

C'est la muqueuse intestinale qui possède l'aptitude d'absorber la bilirubine et de la conjuguer avec l'acide glucuronique. Cette propriété est stimulée par un prétraitement au phénobarbital [91].

b. Rein.

Cf. ci-après.

II. ROLE PARTICULIER DU REIN DANS LE METABOLISME DE LA BILIRUBINE

Les reins peuvent jouer un rôle non négligeable dans le métabolisme de la bilirubine. Leur action peut s'exercer à deux niveaux :

- dégradation de l'hémoglobine ;
- métabolisme de la bilirubine non conjuguée.

La mise en jeu des reins ne s'opère que dans des conditions particulières, pathologiques, lorsque celles-ci ne permettent pas un métabolisme normal dans les organes habituellement intéressés.

Nous envisagerons successivement les deux cas (avec la mise en jeu des reins et leur importance physiologique).

1° - Dégradation rénale de l'hémoglobine.

Les reins ne jouent normalement qu'un faible rôle dans la dégradation de l'hémoglobine des globules rouges. Les érythrocytes sénescents sont, nous l'avons vu, captés et métabolisés par les cellules du système réticulo-endothélial tapissant les sinusoïdes de la rate quoique le foie, et pour une plus faible part la moelle osseuse, participent également à ce processus. Quand cette séquestration extravasculaire des érythrocytes est accélérée, comme dans certaines anémies hémolytiques, les sites secondaires prennent une importance plus grande dans le catabolisme de l'hémoglobine [80].

Par contre, lors de désordres hémolytiques intravasculaires, quand la destruction des cellules rouges est accompagnée d'une libération d'hémoglobine libre dans le plasma, un schéma totalement différent de captage et probablement de catabolisme de l'hémoglobine

a été observé. L'hémoglobine libérée dans le plasma est liée fortement à une α-2-mucoprotéine : l'haptoglobine. Ce complexe empêche l'hémoglobine de s'échapper au travers du glomérule et peut servir à conserver le fer ainsi qu'à prévenir une lésion tubulaire rénale.

KEENE et JANDL [57] administrent à des rats des doses d'hémoglobine marquée au ^{59}Fe par voie intraveineuse, ce qui permet de déterminer exactement la distribution organique du fer hémoglobinique ; le foie se révèle comme étant le site principal de captage de l'hémoglobine, fixant plus de 70 % des complexes hémoglobine-haptoglobine circulants ; la moelle osseuse est le second en importance avec un captage moyen de 20 % de la dose administrée, tandis que la rate ne prend en charge qu'une petite partie seulement (8 %).

Cependant, lorsque l'haptoglobine plasmatique du rat a été épuisée auparavant par une injection massive d'hémoglobine marquée, les reins entrent en jeu et retiennent plus de 50 % de l'hémoglobine injectée ; d'autre part l'hémoglobine plasmatique est évacuée plus rapidement.

Ces observations illustrent le rôle important joué par les reins dans la fixation de l'hémoglobine circulante dans des situations d'hyperhémoglobinémie, soit provoquée expérimentalement, soit due à une hémolyse intravasculaire sévère, quand les capacités de liaison à l'haptoglobine plasmatique sont dépassées.

La dégradation de l'hème hémoglobinique en bilirubine, monoxyde de carbone, et fer est un processus très efficace. Le fer est à peu près complètement réutilisé pour la formation de nouveaux composés ; la globine est dégradée et les acides aminés libérés retournent dans le pool organique ; la partie porphyrinique de l'hème, elle,

n'est pas conservée : elle est dégradée de façon enzymatique en bilirubine et monoxyde de carbone qui sont éliminés rapidement de l'organisme.

Chez le rat l'hème doublement marquée au ^{59}Fe et ^{14}C, injectée par voie intraveineuse, est convertie en bilirubine ^{14}C qui peut être retrouvée dans la bile dans les 3 heures suivant la fixation de l'hémoglobine circulante.

La cinétique de cette conversion n'est pas modifiée quand les doses injectées sont élevées, dépassant les capacités plasmatiques de liaison à l'haptoglobine chez les animaux d'expérience. Ainsi, le catabolisme de l'hémoglobine marquée en bilirubine ^{14}C n'est pas diminué, même dans le cas où des fortes doses de ^{59}Fe hémoglobinique sont retenues par le rein.

Nous pouvons donc en conclure que la dégradation rénale de l'hémoglobine contribue de façon significative à la surproduction de bilirubine dans les situations expérimentales qui reproduisent une hémolyse intravasculaire grave.

L'hyperhémoglobinémie (valeur normale : 0 à 5 mg/100 ml) survient fréquemment en clinique humaine lors d'hémolyse intravasculaire (par exemple hémoglobinurie paroxystique nocturne, "fièvre d'eau noire", réaction aux transfusions, thalassémie majeure, diverses anémies hémolytiques autoimmunes acquises, implantation de prothèses intracardiaques et occasionnellement anémie falsiforme). L'hémoglobinurie, dans ces conditions, signifie soit une déplétion de l'haptoglobine plasmatique résultant d'une hémolyse chronique, soit une destruction massive des cellules rouges provoquant un excès d'hémoglobine plasmatique par rapport au seuil rénal communément

admis (90-100 mg/100 ml chez l'homme).

La présence d'hémoglobine ou d'hémosidérine, ou des deux dans l'urine des patients présentant une hémolyse intravasculaire aiguë ou chronique est observée fréquemment en clinique. L'hémosidérinurie probablement due à la présence de cellules tubulaires rénales chargées en fer, peut survenir lorsque le degré d'hémolyse est insuffisant pour provoquer une hémoglobinurie décelable. Dans ce cas, elle peut constituer un élément diagnostique important devant une anémie inexplicable. En outre, une hémosidérose rénale peut être associée à une déficience de la moelle osseuse en réserves ferriques, et donc à une anémie par déficience en fer.

Ces observations cliniques peuvent s'expliquer facilement sur la base des données expérimentales concernant le traitement de l'hémoglobine par le rein. Les paragraphes suivants passeront en revue rapidement les conceptions courantes concernant la filtration rénale, la réabsorption et le catabolisme de l'hémoglobine par le rein.

a. Filtration et réabsorption de l'hémoglobine par le rein.

La perméabilité du glomérule et probablement des autres capillaires, pour l'hémoglobine, est considérablement plus grande que pour l'albumine, bien que les deux protéines soient de poids moléculaires analogues.

La structure et les propriétés physiques de la molécule d'hémoglobine offrent une explication possible : l'hémoglobine, tétramère α_2 et β_2, se dissocie facilement et de façon réversible en deux dimères $\alpha\beta$ de poids moléculaire égal à la moitié de celui du composé d'origine. La dissociation du tétramère en ses dimères semble être une condition préalable à la filtration glomérulaire.

Moins d'une heure après l'administration intraveineuse d'hémoglobine à des rats et à des doses provoquant une hémoglobinurie, il apparaît dans le cytoplasme de nombreuses cellules du tube proximal des gouttelettes benzidine-positives, représentant probablement l'hémoglobine absorbée. Les gouttelettes disparaissent au cours des heures suivant la fin de l'hémoglobinurie et des granules de fer ou de ferritine apparaissent et persistent dans le cytoplasme des cellules tubulaires [30].

Pendant de nombreuses années, le seuil rénal d'excrétion de l'hémoglobine était attribué uniquement à la réabsorption tubulaire de l'hémoglobine filtrée. Des observations ultérieures ont réfuté cette théorie et ont suggéré plutôt que ce seuil doit être lié totalement à la capacité de liaison plasmatique puisque le complexe haptoglobine-hémoglobine n'est pas filtré par le glomérule. Aujourd'hui, il apparaît que les deux mécanismes sont impliqués dans le déterminisme du seuil rénal de l'hémoglobine.

b. Dégradation rénale de l'hémoglobine.

BUNN et JANDL [15] ont étudié le catabolisme de l'hémoglobine fixée par le parenchyme rénal après injections de petites doses d'hémoglobine marquée chez des rats dont l'haptoglobine a été neutralisée auparavant. Ils ont montré, au moyen de prélèvements sériés, que les fractions hème et globine disparaissent rapidement du rein, abandonnant le fer qui est mobilisé plus lentement : plus de 50 % du ^{59}Fe initialement présent dans les reins persistent jusqu'à deux semaines après l'injection intraveineuse d'hémoglobine marquée. Ces observations sont résumées dans la figure n°4.

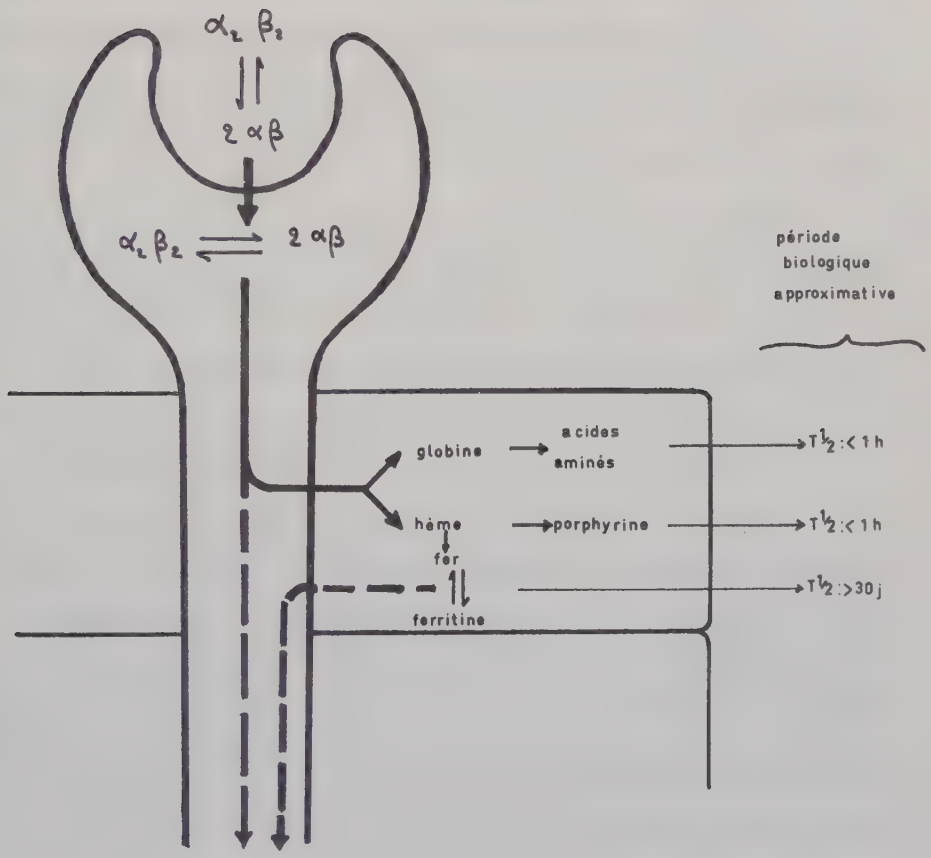

Fig. n°4 : Mécanisme proposé pour le métabolisme de l'hémoglobine par le néphron de rat.
(d'après BUNN H. F. & JANDL J. H.) [78].

c. Conversion enzymatique de l'hème hémoglobinique en bilirubine par le rein.

Comme le rein n'est pas normalement impliqué dans la destruction des cellules rouges ou de l'hémoglobine, il présente habituellement une activité hème-oxygénase très faible. Lors d'hémolyse intravasculaire grave, le rein peut répondre à l'hémoglobinurie en augmentant cette activité.

PIMSTONE et coll. [81, 82] provoquent une hémoglobinurie sur des rats par injection intraveineuse d'hémoglobine, et mesurent l'activité hème-oxygénase du rein : après une brève phase d'attente, l'activité atteint rapidement un pic élevé entre la 6e et la 16e heure et revient à sa valeur normale de base après la 48e heure. L'enzyme rénale semble avoir une demi-vie apparente de 6 heures environ.

Les caractéristiques des courbes de temps et de réponse à la dose injectée, ainsi que l'effet des inhibiteurs métaboliques (cyclohexamide, actinomycine D...) qui inhibent la stimulation, suggèrent fortement que l'induction de l'hème oxygénase doit être produite par son substrat, à savoir l'hémoglobine. L'intensité de la stimulation de l'activité enzymatique chez le rat hémoglobinurique indique que dans de de telles conditions les reins peuvent devenir un site majeur de formation des pigments biliaires.

Ces observations suggèrent, encore une fois, que la dégradation rénale de l'hémoglobine peut contribuer de manière significative à la surproduction de pigment biliaire qui accompagne invariablement une hémolyse intravasculaire sévère.

En temps normal, le catabolisme de l'hémoglobine est pris en charge par les cellules du système réticulo-histiocytaire tapissant les

sinusoïdes de la rate, du foie, de la moelle osseuse. Dans les reins, PIMSTONE et coll. [81, 82, 83] ont essayé de définir plus précisément ment la localisation cellulaire de ce catabolisme. La stimulation de l'hème-oxygénase rénale par l'hémoglobine est limitée à peu près exclusivement au cortex, le tissu interstitiel de soutien de la médullaire étant dépourvu d'activité hème-oxygénase microsomale. L'examen histologique de reins pendant cette période de stimulation de l'enzyme ne révèle pas d'infiltration du cortex par des cellules mononucléées (cellules phagocytaires du S. R. H.) et l'hémoglobine n'est pas détectable dans les glomérules ou les tubules.

Cette étude, associée à d'autres expériences, prouve que des cellules différentes des cellules du S. R. H. possèdent l'équipement enzymatique nécessaire au catabolisme de l'hème hémoglobinique.

Afin de mesurer directement l'activité hème-oxygénase, dans les tubules et les glomérules rénaux isolés, la technique de Tenhunen [101] a été utilisée : l'activité est stimulée dans les cellules épithéliales tubulaires [82, 83], mais pas dans les glomérules de lapins traités à l'hémoglobine.

Ces expériences de stimulation enzymatique démontrent d'autre part que l'activité hème-oxygénase rénale est régulée par l'hémoglobine luminale du tubule qui a été filtrée par le glomérule rénal, et non par le taux d'hémoglobine plasmatique.

d. Rapprochement entre les observations expérimentales et les cas clinicopathologiques.

Ces observations indiquent que l'homme et les animaux d'expérience possèdent un mécanisme efficace pour la prévention de la perte d'hémoglobine lors de désordres hémolytiques. Dans l'hémolyse intra-

vasculaire, la filtration glomérulaire de l'hémoglobine survient seulement quand les capacités de liaison avec l'haptoglobine plasmatique sont dépassées. Même dans ces circonstances, une partie de l'hémoglobine filtrée est réabsorbée et activement métabolisée dans l'épithélium tubulaire rénal avec récupération du fer. L'hémoglobinurie, avec perte résultante du fer et des protéines pour l'organisme, ne survient que lorsque le seuil de réabsorption est dépassé.

Il faut noter cependant qu'une augmentation de l'absorption ou de la filtration de l'hémoglobine lors d'hémolyse intravasculaire chronique n'a pas été démontrée. D'ailleurs, l'observation par BUNN et JANDL [15] que le fer n'est mobilisé que lentement dans les reins, après avoir été séparé de l'hème, peut dénoter l'importance limitée des reins dans la conservation du fer hémoglobinique à des fins métaboliques. Cette lenteur de la mobilisation peut, d'autre part, fournir une explication pour l'hémosidérinurie qui accompagne fréquemment l'hémoglobinurie lors de désordres hémolytiques intravasculaires. Cette hémosidérinurie peut se produire sans coexistence d'hémoglobinurie, comme on peut le rencontrer lors de certaines anémies par déficience en fer (perte chronique de fer héminique dans l'urine lors d'hémolyse).

Le rôle fonctionnel du système hème-oxygénase microsomale dans la pathogénie du dysfonctionnement hémoglobinurique rénal est difficile à définir. Il est bien établi que, dans l'hémoglobinurie, la filtration d'une grande quantité de pigment sanguin peut être associée à une lésion rénale aiguë. Une toxicité directe de l'hème au niveau cellulaire a été impliquée dans la génèse de la lésion rénale, particulièrement si une anoxie y est associée [80]. On est tenté de penser que la dégradation rapide de l'hème absorbé par le rein peut être

un mécanisme destiné à minimiser le dommage rénal survenant lors de néphropathie hémoglobinique. Une telle hypothèse implique une toxicité faible ou nulle de la bilirubine, donc sa conjugaison locale.

2°- Métabolisme rénal de la bilirubine.

a. Mise en évidence d'une activité de filtration, réabsorption et sécrétion de la bilirubine par le rein.

La bilirubine conjuguée est sécrétée en quantités notables dans l'urine de malades présentant des concentrations élevées de bilirubine conjuguée plasmatique (lors de cholestase), contrairement aux sujets normaux ou présentant une hyperbilirubinémie non conjuguée.

La bilirubine conjuguée, pôlaire, et la bilirubine non conjuguée, non pôlaire, sont toutes deux fortement liées à l'albumine sérique ; mais la bilirubine non fixée sur cette albumine est la seule disponible pour la filtration glomérulaire au niveau du rein.

L'excrétion de la bilirubine conjuguée est fonction de cette fraction non liée à l'albumine, donc filtrable.

Chez le rat, cette bilirubine filtrable a été mesurée dans le sérum et l'urine, après avoir opéré une ligature du canal biliaire, ou bien après perfusion continue de bilirubine non conjuguée [29, 2, 3], sa clearance rénale est comparée avec celle de la créatinine endogène : la clearance rénale de la bilirubine est toujours inférieure à celle de la créatinine ce qui suggère que la bilirubine filtrée est réabsorbée dans les tubules rénaux. Le calcul de la quantité filtrée de bilirubine non fixée démontre que comparativement, l'excrétion de la bilirubine est extrêmement faible, ce qui dénote manifestement une réabsorption. La réabsorption tubulaire de la bilirubine non conjuguée est semblable

à celle décrite dans l'arbre biliaire par OSTROW [79] et semble se produire par diffusion (l'excrétion rénale des sels biliaires se ferait sur le même mode [10]).

Il avait déjà été admis que l'excrétion de la bilirubine conjuguée est assurée en grande partie par filtration glomérulaire. La démonstration histochimique de la présence de bilirubine conjuguée dans les cellules du tube contourné proximal lors de jaunisse par destruction (post-hépatique) confirme la théorie d'une filtration et d'une réabsorption tubulaires [41].

Des études sur reins de rats isolés à l'aide d'un milieu sans protéines, contenant de la bilirubine conjuguée [40, 41], confirment que la bilirubine conjuguée non liée aux protéines plasmatiques est librement filtrée par le glomérule et ensuite en grande partie réabsorbée dans le tubule.

Par contre, la preuve d'une sécrétion tubulaire n'a pas été apportée. Elle a seulement été mise en évidence sur le rein de crapaud in vitro par YAMAMOTO et TAKCHIKO [108].

b. Mise en évidence d'une activité glucuronyl-transférase du rein.

FRANCO et coll. [36, 37] ont démontré que des rats hépatectomisés et éviscérés conservent leurs capacités à conjuguer la bilirubine injectée par voie intra-veineuse. Par contre, s'ils sont également néphrectomisés bilatéralement, ils perdent totalement cette capacité.

BARAC et HEIWEGH [48], en perfusant des chiens totalement éviscérés ou bien des reins isolés de chiens avec du sang additionné de bilirubine non conjuguée, ont provoqué une hyperbilirubinurie qui dé-

passe largement le taux habituel ; ces auteurs ont identifié les glucuronoconjugués de la bilirubine dans l'urine.

STEVENSON et DUTTON [99] ont observé le potentiel de glucuronoconjugaison de coupes et d'homogénats de reins de cochon d'Inde en présence de substrats tels que l' 0-aminophénol, l'acide 0 -aminobenzoïque et le menthol ; par contre, ils n'ont pas utilisé la bilirubine comme substrat.

Enfin, les expériences de transplantation rénale de rats Wistar sur des rats Gunn (lignée de rats souffrant d'une jaunisse héréditaire non hémolytique, à bilirubine non conjuguée, due à une déficience en bilirubine glucuronyl-transférase) confirment l'activité glucuronyl-transférase du rein [34, 18, 35]. Le rein transplanté est capable de conjuguer suffisamment de bilirubine pour réduire le taux plasmatique moyen de 160 à 54 mg/l au bout d'une période de 48 heures. Cette amélioration de la bilirubinémie est assurément due au rein greffé [34]. Cette activité est loin d'être négligeable puisqu'elle atteint 90 % de l'activité hépatique, excepté pour les femelles âgées de moins de six semaines chez lesquelles elle est seulement 1/15e de l'activité hépatique. Ceci est illustré dans le tableau n°1, résultat des travaux de FOLIOT et coll. [34].

Des différences sexuelles semblables dans l'activité enzymatique rénale ont été rapportées par DE SCHEPPER et VAN DER STOCK [26], qui perfusent des reins isolés de chien avec du sang contenant 50 mg d'hémoglobine par 100 ml. Ces auteurs observent que les reins de chienne présentent un fort taux de bilirubine conjuguée dans le plasma sans modifications de la bilirubine urinaire, tandis que les reins des mâles présentent beaucoup de bilirubine urinaire sans augmenta-

	Wistar mâles adultes	Wistar femelles adultes	Wistar mâles 6 semaines	Wistar femelles 6 semaines	Gunn hétérozygotes mâles adultes	Gunn homozygotes femelles adultes
Foie	1,94 ± 0,13	1,69 ± 0,25	1,98 ± 0,16	2,18 ± 0,28	0,91 ± 0,07	0
Rein	0,43 ± 0,03	0,38 ± 0,04	0,38 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0

Tableau n°1 : Activité bilirubine-glucuronyl-transférase dans différentes lignées de rats.

L'activité BGT est exprimée en milligrammes de bilirubine conjuguée par heure et par gramme de foie.

(d'après FOLIOT & coll.) [34].

tion du taux plasmatique de bilirubine conjuguée.

Lors des expériences de transplantation rénale d'autre part, une augmentation de l'activité glucuronyl-transférase du rein greffé a été notée, suggérant une induction enzymatique par la bilirubine non conjuguée du receveur. La preuve de l'action inductrice de celle-ci avait été rapportée par THALER [102] et il est tout à fait possible que l'augmentation de l'activité bilirubine-glucuronyl-transférase du rein transplanté soit vraiment due à un effet inducteur.

Une fois conjuguée par le rein greffé, la bilirubine est facilement prise en charge par le foie du receveur. En fait, la bilirubine conjuguée n'est pas mesurable dans le sang périphérique ou l'urine, mais apparaît par contre rapidement dans la bile. La ligature du canal biliaire inverse cet effet et provoque l'apparition rapide de bilirubine conjuguée dans le plasma et l'urine.

La transplantation rénale ne semble pas être capable de provoquer une induction de l'activité glucuronyl-transférase hépatique chez le rat Gunn receveur, du moins pendant les périodes de temps utilisées au cours de ces expériences.

L'activité glucuronyl-transférase du rein de rat normal est limitée au cortex et sa valeur est d'environ 202 ± 28 m Mole/g/mn. Elle est nulle chez le rat Gunn.

Le principal pigment formé par conjugaison rénale est la bilirubine monoconjuguée. Néanmoins dans les expériences de perfusion de rein isolé la proportion de diconjugués par rapport aux monoconjugués dans l'urine est supérieure à celle du liquide de perfusion. On ne sait pas si cela indique une seconde conjugaison du pigment au niveau

de la membrane plasmique (comme dans le foie) ou bien une clearance différente pour les deux types de conjugués [41].

Le processus d'élimination de la bilirubine est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. Bien que ce métabolisme soit assuré par plusieurs organes (foie surtout, mais également le rein et la muqueuse intestinale qui jouent le rôle de "sécurité" lors d'atteinte fonctionnelle hépatique), il est des cas où le système est en défaut, et l'accumulation de bilirubine qui en résulte provoque une véritable intoxication.

Les hyperbilirubinémies seront de nature conjuguée ou non conjuguée et pourront reconnaître des causes diverses. C'est cette toxicité de la bilirubine que nous allons envisager maintenant.

-:-:-:-:-

Chapitre deuxième

PATHOLOGIE LIEE A LA BILIRUBINE

-:-:-:-

I. TOXICITE DE LA BILIRUBINE

1°- Bilirubine conjuguée.

Des sujets présentant un ictère post-hépatique se révèlent plus susceptibles de développer des lésions rénales après une opération chirurgicale ou un épisode d'hypertension que les sujets non ictériques [42] ; l'incidence des lésions rénales paraît être en relation avec l'intensité de l'ictère. Chez les animaux à ligature du canal biliaire, la lésion histologique s'est révélée être une nécrose tubulaire focale. La substance responsable de la sensibilité augmentée du parenchyme rénal à une lésion ischémique n'a pas été identifiée, bien qu'il apparaisse indirectement que la bilirubine conjuguée et les sels biliaires puissent être impliqués. Lors de cholestase, l'excrétion de ces substances dans l'urine devient importante. Seule une petite fraction de bilirubine conjuguée et de sels biliaires, non liée aux protéines plasmatiques, est soumise à la filtration glomérulaire et ensuite à la réabsorption tubulaire ; cette fraction est la cause la plus probable des lésions toxiques, puisque l'addition d'albumine au milieu de perfusion diminue de façon nette les anomalies induites par la bilirubine conjuguée sur un rein isolé et perfusé [42]. Ainsi, un taux plasmatique élevé de bilirubine conjuguée paraît être responsable de l'augmentation de sensibilité des tubules rénaux aux lésions ischémiques.

Cependant, les sels biliaires peuvent également se révèler cytotoxiques pour les tubules rénaux proximaux, particulièrement pour les membranes plasmiques. Puisque les sels biliaires sont liés moins étroitement à l'albumine que la bilirubine conjuguée, des concentrations plus importantes de sels non liés peuvent être présentes dans le plasma lors de jaunisse d'obstruction et peuvent ainsi s'associer à des dommages tubulaires. La toxicité rénale des sels biliaires a été démontrée par AOYAGI et LOWESTEIN [4] : une insuffisance rénale transitoire, caractérisée par une chute du taux de filtration glomérulaire et de l'excrétion sodique, se développe chez des rats après perfusion de cholate et de taurocholate de sodium, et est accompagnée d'une période de 30 mn d'ischémie rénale.

De même, dans une étude sur les modifications histochimiques du rein de rat après ligature du canal biliaire, DE VOS et coll. [27] suggèrent que l'apparition de vacuoles phosphatase-alcaline positives dans le cytoplasme apical des tubules proximaux est en relation, au moins en partie, avec une augmentation de l'excrétion des sels biliaires dans l'urine. Contrairement au foie, dans lequel les sels biliaires provoquent des lésions des canalicules biliaires et des cellules hépatiques, le rein semble répondre différemment aux effets toxiques des sels biliaires et les lésions sont légères.

L'étude de la toxicité de la bilirubine conjuguée sur le rein de rat isolé [42] montre que les constantes physiologiques du rein (taux de filtration glomérulaire, débit sanguin efficace) ne sont pas influencées par l'addition de bilirubine, de sels biliaires et d'albumine bovine au milieu de perfusion.

La microscopie optique [42] ne révèle pas de modifications

au niveau des tubes contournés proximaux lors d'adjonction de bilirubine conjuguée au milieu de perfusion. Par contre, les altérations sont bien visibles au microscope électronique, touchant la membrane protoplasmique et celle des organites de nombreuses cellules tubulaires proximales. Les microvillosités de la bordure en brosse révèlent un désordre, une diminution de taille et une désintégration ; les mitochondries sont gonflées et leur forme est irrégulière ceci étant dû à leur compression et donc à leur conformation dans l'espace disponible ; les crêtes mitochondriales sont arrangées irrégulièrement et paraissent assemblées en amas, ceci étant en relation avec la déformation des mitochondries ; dans la portion basale des cellules épithéliales, la membrane plasmique invaginée montre une légère ondulation ; le nombre des ribosomes libres est légèrement augmenté.

Pour ce qui est des sels biliaires, les lésions n'apparaissent que lorsque la perfusion contient un mélange de taurolithocholate et d'albumine : la microscopie optique révèle une desquamation et vacuolisation des cellules tubulaires, ce qui se traduit en microscopie électronique par une augmentation de taille des phago-lysosomes qui contiennent un matériel osmiophile et membraneux, une formation diverticulaire au niveau de la membrane plasmique invaginée et une hyperplasie focale du reticulum endoplasmique lisse.

Les études histoenzymologiques, histochimiques et histomorphologiques sur le rein de rat, après destruction du canal biliaire [27], mettent en évidence des modifications au niveau du segment médial du tube contourné proximal. Ces modifications surviennent brutalement et en deux périodes successives : de la 12e heure jusqu'au 10e jour suivant la ligature du canal biliaire, les modifications les plus frappantes sont d'ordre histoenzymologique et histochimique. Des vacuoles cyto-

plasmiques (1,5 - 2,5 μ de diamètre) présentant une bordure phosphatase alcaline positive apparaissent dans la portion apicale des cellules et augmentent en nombre et en activité enzymatique après la 24e heure ; puis elles disparaissent après la 33e heure en faisant place à des granules (1 - 1,5 μ) également positifs à la phosphatase alcaline, dont le nombre maximum est atteint après 2 jours d'obstruction. Puis la coloration des granules devient moins intense et hétérogène, alors que le cytoplasme environnant se colore positivement de façon diffuse.

Les granules phosphatase acide et β-glucuronidase positifs, c'est-à-dire les lysosomes, ne montrent pas de changements pendant les premiers jours, mais leur activité enzymatique diminue après 8-10 jours ; dans plusieurs sections tubulaires. les lysosomes disparaissent et le cytoplasme devient diffusément positif.

La seconde période survient à partir du 10e jour et correspond à une accumulation de pigment. Le cytoplasme prend une coloration diffuse pour la phosphatase alcaline, phosphatase acide et β-glucuronidase ; des corps pigmentés cytoplasmiques fixés à la membrane, mesurant 3-6 μ de diamètre apparaissent dans la portion basale des cellules tubulaires. Ils sont d'abord limités à la portion proximale du segment moyen des tubes proximaux pour s'étendre à tout le segment moyen au 22e jour. Un certain nombre de ces corps se colorent positivement aux phosphatases et à la glucuronidase, de façon diffuse ; ils ont tous une apparence hétérogène, contenant des éléments PAS-positifs, diastase résistantes et schmorl positifs, ainsi que de la bilirubine de nature non-conjuguée (Fouchet (+) et éthylanthranilate (-)). La totalité du cytoplasme entourant ces corps pigmentés montre une réaction diffuse pour la bilirubine conjuguée (Fouchet (+) et éthylanthranilate (+)).

Les modifications histochimiques et histoenzymologiques survenant chez les rats, après ligature biliaire, sont comparables à celles observées chez des rats alimentés avec un régime riche en acide cholique ; on pourrait donc penser que les vacuoles phosphatase alcaline positives apparaissant précocement dans le cytoplasme apical des cellules, représentant des vacuoles de résorption, sont dues à une augmentation de la concentration des sels biliaires dans le filtrat glomérulaire. Mais l'étude comparative de rats à destruction biliaire avec des rats subissant à la fois la ligature et le régime riche en acide cholique, montre que les vacuoles sont plus grandes et plus nombreuses lorsqu'une augmentation simultanée de la bilirubine conjuguée survient.

Les vacuoles puis les granules positifs à la phosphatase alcaline semblent représenter deux aspects morphologiques successifs de la même inclusion cellulaire, subissant des modifications progressives au cours du temps. D'autre part, le passage d'une coloration intense et limitée aux granules à une coloration diffuse du cytoplasme environnant suggère une rupture, ou du moins une modification de perméabilité des membranes entourant les vacuoles. Les granules phosphatase acide et β-glucuronidase positifs subissent des modifications semblables au même moment.

Ces modifications coincident avec l'apparition de ce que l'on appelle les "corps pigmentés" 8 - 10 jours après l'obstruction biliaire. Ces corps pigmentés (de couleur brun-jaune) sont considérés comme des lysosomes secondaires dans leqquels les inclusions positives aux deux phosphatases et à la β-glucuronidase, ainsi que des portions de cytoplasme dégénéré sont séquestrées. A partir du 12e jour après l'obstruction biliaire, l'accumulation du pigment biliaire et la forma-

tion des corps pigmentés représentent les modifications les plus frappantes observées ; les inclusions montrent les propriétés histochimiques des lipofuscines. On trouve de la bilirubine non conjuguée dans les corps pigmentés et de la bilirubine conjuguée dans le cytoplasme environnant.

Ces résultats peuvent s'interpréter comme une conjugaison et une sécrétion de la bilirubine par les cellules du tubule rénal : une partie de la bilirubine non conjuguée présente également dans le plasma (très probablement la fraction non liée à l'albumine)diffuse ou est captée dans les cellules du tubule rénal. Ces cellules peuvent accumuler le pigment dans les lysosomes puis le conjuguer et l'excréter dans la lumière tubulaire. L'imprégnation cytoplasmique diffuse des cellules tubulaires par la bilirubine conjuguée peut être considérée comme le résultat du captage et de la conjugaison continus du pigment biliaire. Par ailleurs la bilirubine conjuguée est éliminée par filtration glomérulaire, ce qui provoque une augmentation de la concentration de bilirubine dans la lumière tubulaire et éventuellement une perturbation de la sécrétion dans les cellules tubulaires.

Quand le captage et la conjugaison du pigment biliaire dépassent la sécrétion, il se produit une accumulation intracellulaire. Cette augmentation de la concentration de bilirubine intracellulaire pourrait également être une des causes de précipitation du pigment biliaire et de séquestration dans les vacuoles autophagiques. Un phénomène inverse de déconjugaison serait également possible, lié à l'action de la β -glucuronidase lysosomiale présente dans ces organites il pourrait constituer une autre explication de la nature non conjuguée de la bilirubine déposée dans les corps pigmentés.

L'observation des corps pigmentés suggère que ces inclusions cellulaires représentent des dégradations cytoplasmiques focales qui ne sont pas seulement causées par l'accumulation intracellulaire de bilirubine, mais aussi à l'effet des autres constituants biliaires retenus, probablement les sels biliaires. Le dépôt de pigments biliaires dans ces même structures peut indiquer que la bilirubine intracellulaire précipite ou s'agglutine préférentiellement sur les constituants cellulaires endommagés.

2°- Bilirubine non conjuguée.

De nombreux chercheurs ont rapporté que la bilirubine a un effet toxique sur le métabolisme énergétique des cellules [105]. DAY (1954) [24] démontre qu'elle diminue la respiration de cerveaux broyés de rats in vitro ; WALTERS et BOWEN (1957) [106] trouvent un effet semblable ; MENKEN et WEINBACH [71] et d'autre part ZETTERSTROM et ERNSTER (1956) [110] font de nouvelles études au niveau cellulaire et trouvent que la bilirubine découple la phosphorylation oxydative dans les mitochondries de cerveau et de foie : ces derniers rapportent que 0,3 mM de bilirubine inhibent à peu près complètement la phosphorylation et dépriment partiellement la respiration quand on utilise le glutamate comme substrat. L'addition de NAD et de cytochrome C renverse l'inhibition de la respiration, mais ne restaure pas la phosphorylation.

Le site d'action précis de la bilirubine a été déterminé en étudiant ses effets sur la respiration cellulaire avec des substrats variés: 0,4 mM de bilirubine inhibent la respiration avec le glutamate ou le succinate, mais n'ont pas d'effet sur l'oxydation de l'ascorbate. Ainsi, la bilirubine exerce un effet bloquant entre la flavoprotéine et le cyto-

chrome C dans la chaîne respiratoire. ERNSTER (1961) [31] avait également remarqué que l'oxydation du glutamate et du succinate en présence d'ADP était inhibée par la bilirubine au niveau des mitochondries hépatiques.

La bilirubine provoque d'autre part une inhibition à peu près complète de l'activité ATPase endogène des mitochondries cérébrales et hépatiques [105].

Enfin, la recherche du taux des divers intermédiaires de la glycolyse a permis de déterminer les effets de la bilirubine sur l'activité des enzymes glycolytiques in vitro [56]. La découverte d'une augmentation significative des concentrations de glucose-6-phosphate et de fructose-6-phosphate dans la glycolyse cérébrale du rat Gunn (présentant une hyperbilirubinémie chronique, non conjuguée, héréditaire) peut indiquer une inhibition de l'activité phosphofructokinase (PFK). Les activités glycéraldehyde-3-phosphate deshydrogènase (GAPDH), pyruvate-kinase (PK) sont également affectées, ainsi que, probablement, la fixation du glucose. L'inhibition de la production de lactate a été signalée in vitro, indiquant la possibilité d'un effet inhibiteur touchant une ou plusieurs enzymes situées entre l'aldolase et le lactate-deshydrogénase. Bien que l'influence de la bilirubine sur les activités GAPDH et PK n'ait pas été démontrée clairement in vivo, cette étude peut tout de même apporter une preuve de l'action du pigment sur la réduction de l'activité glycolytique dans les cellules cérébrales.

Ces recherches in vitro ont donc démontré que la bilirubine non conjuguée interfère avec les fonctions vitales des cellules. Cette toxicité se traduit, chez l'individu présentant une hyperbilirubinémie non conjuguée, par une atteinte rénale et surtout cérébrale, cette dernière

étant due au caractère lipophile du pigment.

Chez le nouveau-né, elle sera responsable d'une encéphalopathie, appelée ictère nucléaire (ou Kernictère), associé chez le rat de lignée Gunn à une néphropathie. Néanmoins, cette toxicité ne se révèle que lorsque le taux de bilirubine non conjuguée plasmatique dépasse les capacités de fixation de l'albumine sérique.

On a ainsi pu démontrer que l'albumine est capable d'annuler l'effet inhibiteur de la bilirubine sur les mitochondries [105]. Quand le rapport molaire : albumine/bilirubine est supérieur à 1, toute la bilirubine est complexée par l'albumine. (Notons dans le même ordre d'idée qu'une protéine cellulaire, le ligandin, est capable de jouer le même rôle que l'albumine [54, 59]. Son absence dans certains organes, tels que le cerveau, les rend plus sensibles aux effets toxiques de la bilirubine (Kernictère)).

Du point de vue histopathologique, la bilirubine non conjuguée provoque un gonflement et des modifications ultrastructurales des mitochondries, ces effets étant prévenus ou du moins très réduits par l'adjonction d'albumine [42].

Il faut noter que les mitochondries du nouveau-né sont beaucoup plus sensibles aux effets toxiques de la bilirubine que celles de l'adulte, ce qui peut expliquer l'apparition très rapide de l'encéphalopathie pendant la période néonatale [39, 105].

Nous verrons, dans un chapitre ultérieur, que la bilirubine non conjuguée peut présenter une toxicité non plus métabolique mais purement physique lors d'accumulation et de cristallisation par excès de concentration dans certains organes tels que le rein (cf. p. -Anatomie pathologique du rein du rat Gunn). Cette accumulation provoque une nécrose tissulaire avec des répercussions physiologiques graves.

II. LES HYPERBILIRUBINEMIES HEREDITAIRES

Des désordres héréditaires dans la fixation hépatique de la bilirubine, dans sa conjugaison et dans son excrétion ont été décrites chez l'homme et les animaux [38]. Tous ces désordres s'accompagnent d'un symptôme commun : l'ictère associé à des troubles variables selon que la bilirubine en excès dans le sang est sous forme conjuguée ou non conjuguée. Certains agents pharmacologiques spécifiques produisent des effets semblables à ceux observés dans ces anomalies, et l'étude comparée des troubles héréditaires et des effets pharmacologiques a permis une meilleure compréhension des mécanismes de fixation, de conjugaison et d'excrétion de la bilirubine par le foie.

1°- Fixation hépatique de la bilirubine.

a. Eczéma du mouton Southdown.

CORNELIUS et GRONWALL [22] ont décrit un défaut héréditaire dans la fixation hépatique de la bilirubine, la bromosulphophtaléine (BSP), le vert indocyanine, le rose Bengal et la phylloerythrine chez le mouton Southdown. Le désordre est détecté quand le mouton développe un eczéma cutané par photosensibilisation. Cet eczéma résulte de l'accumulation dans la peau de phylloérythrine qui est un métabolite de la chlorophylle. Ce défaut est vraisemblablement héréditaire et serait dû à un gène autosomal récessif. Le mécanisme d'apparition du désordre est inconnu. A l'histologie, le foie semble normal.

L'effet des médicaments sur les mécanismes de fixation hépatique n'a pas été beaucoup étudié, en partie parce que les techniques adéquates pour la quantification de la fixation par le foie sont manquantes ; il a été cependant remarqué que des patients recevant un extrait

de fougère mâle en vue du traitement d'une infestation vermineuse, développaient une hyperbilirubinémie. La purification de l'extrait de fougère a permis l'isolement d'acide flavispidique qui, lorsqu'il est administré au lapin, provoque une rétention de BSP, de vert indocyanine et de bilirubine non conjuguée. On peut voir là une interférence avec les mécanismes de fixation hépatique.

b. Syndrome de Gilbert.

Chez l'homme, une hyperbilirubinémie non conjuguée, chronique, avec des concentrations sériques de bilirubine allant de 1,5 - 0,5 mg/100 ml est observée dans le syndrôme de Gilbert, qui a des causes multiples, dont des états hémolytiques compensés, une augmentation de la production des pigments biliaires à partir de sources autres que les érythrocytes mâtures circulants, et enfin l'hépatite virale [39]. Il provient également d'une anomalie héréditaire à caractère autosomal dominant.

Dans plusieurs familles présentant une déficience hépatique partielle en glucuronyl-transférase, la jaunisse bénigne a été également observée. Dans de très nombreux cas, la pathogénie est inconnue et les études sur la formation des glucuronides invivo et sur l'activité glucuronyl-transférase in vitro sont d'ordinaire normales. Une altération du transfert de la bilirubine du plasma vers les cellules hépatiques a été proposée et confirmée par preuve indirecte, mais pas démontrée directement. En théorie, des désordres de la membrane plasmique ou de la fixation des anions organiques par les protéines cytoplasmiques peuvent expliquer ce syndrome observé communément.

L'ictère est ordinairement accentué par l'exercice, la fièvre, la gestation, l'alcool et des drogues variées, tels que les contraceptifs

oraux. Le mécanisme de ces effets est inconnu.

2°- Conjugaison de la bilirubine.

Les défauts héréditaires dans la conjugaison de la bilirubine fournissent les symptômes les plus frappants d'ictère et de toxicité résultant d'une hyperbilirubinémie.

a. Le rat Gunn.

Une hyperbilirubinémie chronique, non hémolytique, non conjuguée, a été décrite dans une lignée mutante du rat Wistar par GUNN en 1938 [45]. Ce désordre est d'origine génétique et est dû à un gène autosomal récessif. Les troubles sont dûs à une déficience en enzyme glucuronyl-transférase chez ce rat qui conserve néanmoins la capacité d'excréter dans sa bile de la bilirubine conjuguée administrée par voie intra-veineuse.

Le rat mutant n'est pas ictérique à la naissance, car la bilirubine foetale est exportée au travers du placenta et donc conjuguée et excrétée par le foie maternel. Après la naissance, la bilirubine n'est plus conjuguée et sa concentration sérique atteint 10 - 15 mg/100 ml. Il ne se produit pas de bilirubinurie et d'autre part, la bile est théoriquement décolorée, contenant seulement quelques traces de bilirubine non conjuguée. Le foie est morphologiquement normal au microscoque optique et présente fréquemment de grandes zones de reticulum endoplasmique lisse au microscope électronique.

Les rats Gunn hétérozygotes, eux, ne sont pas ictériques car ils ne présentent qu'une déficience partielle dans la formation du glucuronide.

L'hyperbilirubinémie non conjuguée se traduit chez le rat Gunn par un ictère précoce s'associant très rapidement à une encéphalopathie (Kernictère), une néphropathie (insuffisance de réabsorption d'eau par le rein, nécrose de la papille rénale) et un taux de mortalité spontanée supérieur à la normale chez les vieux animaux.

Le rat Gunn constitue un modèle expérimental très intéressant en toxicologie et en pathologie comparée et mérite une étude plus aprofondie que nous envisagerons dans un chapitre ultérieur.

b. Syndrome de Crigler et Najjar.

Un désordre comparable à celui du rat Gunn a été décrit chez l'homme par CRIGLER et NAJJAR en 1952 [23]. En 1968, sur 20 cas rapportés dans la littérature, 14 étaient morts au cours de l'enfance des suites de l'encéphalopathie dûe à la bilirubine non conjuguée, et plusieurs autres avaient développé le Kernictère au cours de l'adolescence. Certains ont pu survivre à l'âge adulte, malgré un Kernictère grave. A l'autopsie, ces derniers -comme les rats Gunn adultes- ne révèlent pas de coloration du système nerveux central par la bilirubine, mais montrent des lésions des neurones et de la glie qui ont pris place pendant la vie néonatale, au moment où le cerveau semble plus sensible à la toxicité de la bilirubine [55].

Le syndrome peut se présenter sous deux formes cliniquement semblables, mais différentes génétiquement :

- la plupart des malades appartiennent au type 1 dans lequel l'hyperbilirubinémie est habituellement importante (20-45 mg/100 ml) et le Kernictère fréquent. Comme chez le rat Gunn, leur bile est décolorée et ne contient que quelques traces de bilirubine non conjuguée. La déficience est transmise par un caractère autosomal récessif, et

l'hyperbilirubinémie n'est pas modifiée par une administration prolongée de phénobarbital ;

- les patients présentant le désordre de type 2 montrent en général une hyperbilirubinémie moins grave (8-22 mg/100 ml) et pas de Kernictère. Leur bile est pigmentée et contient des taux importants de glucuronide de bilirubine. La déficience est transmise selon un mode variable qui serait compatible avec un caractère autosomal dominant, à expressivité variable. Ces malades répondent de façon remarquable à l'administration de phénobarbital, avec une complète amélioration de la jaunisse pendant 5 à 12 jours et une diminution de la concentration sérique de bilirubine non conjuguée jusqu'à 1,6-2,2 mg/100 ml. Après l'arrêt du traitement au phénobarbital, l'hyperbilirubinémie réapparaît en 10 jours. On pense que le phénobarbital stimulerait l'activité glucuronyl-transférase du foie du malade.

Le fait que les patients de type 1 soient homozygotes et ceux de type 2 hétérozygotes pour un même gène semble improbable, car aucune famille n'a jusqu'à présent révèlé les deux types de déficience en même temps. La différence entre les types 1 et 2 reflète probablement des différences de structure dans une seule glucuronyl-transférase, ou bien des différences dans le contrôle de la synthèse protéique.

Bien que beaucoup de drogues interfèrent avec la formation des glucuronides in vivo, peu sont impliquées dans la production d'une jaunisse chez l'homme. L'administration de Novobiocine (antibiotique) est associée à une augmentation du triple dans l'incidence d'une jaunisse grave chez les nouveaux-nés et a également provoqué le développement d'une hyperbilirubinémie non conjuguée chez des adultes. La suppression de l'agent voit la disparition rapide de l'ictère.

Bien que l'hyperbilirubinémie non conjuguée puisse résulter d'un défaut de fixation hépatique de la bilirubine, ou bien de l'inhibition de l'activité glucuronyl-transférase, il a été démontré que la Novobiocine est un inhibiteur spécifique de l'activité glucuronyl-transférase in vitro.

Des effets pharmacologiques analogues, dûs à l'administration d'un médicament, ou dans un sens plus large, dûs à l'"environnement" peuvent s'exercer sur le jeune ou le fœtus. Les deux désordres suivants en sont des exemples.

c. Ictère de l'enfant nourri au sein.

Nous avons vu que certaines mères sécrètent dans leur lait du pregnane-3α-20β-diol qui inhibe l'activité glucuronyl-transférase de l'enfant [92]. Ceci se traduit par une hyperbilirubinémie non conjuguée grave, persistant 3 à 12 semaines et qui rétrocède rapidement l'arrêt de l'allaitement au sein (cf. p. 15).

d. Hyperbilirubinémie néonatale familiale transitoire.

Nous avons déjà parlé également de ce trouble touchant les nouveaux-nés pendant les premiers jours de la vie, avec une jaunisse persistant environ deux semaines (cf. p. 15). On pense que le facteur d'inhibition est un stéroïde progestéronique sécrèté par la mère pendant la gestation, traversant le placenta et bloquant l'activité glucuronyl-transférase du nouveau-né pendant quelques jours après la naissance [7].

Dans ce cas, comme dans celui du syndrome d'allaitement au sein, on ne sait pas si la production de l'inhibition est un caractère hérité par la mère, ou bien si elle est en relation avec l'administration de médicaments.

3°- Excrétion hépatique de la bilirubine.

Deux désordres héréditaires résultant d'une hyperbilirubinémie conjuguée ont été décrits : le syndrome de Dublin-Johnson [28] et le syndrome de Rotor [95]. Bien que très ressemblants par de nombreux aspects, ils sont probablement distincts.

Dans ces deux syndromes, nous observons une réduction de la capacité du foie à excréter la bilirubine conjuguée et la bromosulfophtaleine (BSP). La conjugaison de ces deux substances, ainsi que le stockage de la BSP dans le foie sont normaux, ce qui suggère que le défaut est limité au système de transport excrétoire. L'administration d'un opacifiant radiologique à des malades présentant le syndrome de Dublin-Johnson ne permet pas de visualiser la vésicule biliaire. Chez les patients présentant le syndrome de Rotor, par contre, l'opacifiant est excrété en concentration suffisante pour permettre la visualisation de la vésicule biliaire. Le point majeur de différenciation des deux syndromes est l'accumulation d'un pigment noir dans le foie des individus à syndrome de Dublin-Johnson, contrairement à l'autre affection.

Une information supplémentaire concernant le syndrome de Dublin-Johnson est tirée de l'étude d'un syndrome identique observé chez le mouton "corriedale" [6, 21]. Le pigment hépatique s'accumule chez le mouton et chez l'homme dans les zones centrolobulaires du foie et la microscopie électronique montre qu'il est situé dans les lysosomes. L'étude du pigment isolé du foie du mouton révèle que c'est une mélanine provenant de la polymérisation de métabolites de l'épinéphrine qui s'accumule dans le tissu hépatique par défaut d'excrétion.

La relation entre les deux syndromes est peu claire, bien qu'il y ait eu un cas d'apparition des deux désordres dans une même famille chez l'homme (sans doute par pur hasard). Les quelques données utilisables semblent suggérer que le syndrome de Rotor est transmis avec les caractères d'un gène dominant autosomal. Le syndrome de Dublin-Johnson est, chez l'homme et le mouton, visiblement héréditaire, mais son mode de transmission est encore incertain (c'est probablement un gène autosomal récessif).

L'effet des médicaments sur l'excrétion hépatique de la bilirubine et d'autres substances, telles que la BSP, a fait l'objet d'une étude importante. En particulier, on s'est aperçu que certains contraceptifs anovulatoires, comme l'Enovid, interfèrent avec la capacité du foie à excréter la BSP. Bien que non associé au développement d'une hyperbilirubinémie quand il est administré à des femmes normales, l'Enovid (ou d'autres contraceptifs semblables) associé à la progestérone provoque chez certaines femmes -ayant des antécédents de jaunisses répétées lors de grossesse- le développement d'une hyperbilirubinémie conjuguée. Ceci suggère que certaines femmes peuvent présenter un défaut partiel dans l'excrétion hépatique de la bilirubine conjuguée ; cette déficience partielle pourrait les rendre plus sensibles aux effets de certaines drogues ou de la grossesse que dans le cas des femmes normales. Notons que l'augmentation de la gravité de l'hyperbilirubinémie survient également pendant la gestation chez les femmes atteintes du syndrome de Dublin-Johnson.

Remarque : L'hyperbilirubinémie néonatale physiologique.

Nous avons vu précédemment (cf. p.14) que l'activité de conjugaison du foie ne se met en place qu'à la naissance et que pendant

un certain temps (le plus souvent très court) l'immaturité du système enzymatique est responsable chez le nouveau-né d'une "jaunisse physiologique". Cette hyperbilirubinémie néonatale physiologique survient chez presque tous les nouveau-nés, ainsi que chez les individus nés avant terme.

Cette jaunisse transitoire pourrait causer quelques problèmes (surtout chez les enfants nés avant terme), elle a été étudiée sur des modèles animaux et en particulier chez le rat Gunn qui constitue un outil appréciable en pathologie comparée.

III. LE RAT GUNN

1°- Etude générale - Intérêt.

a. Définition.

Le rat Gunn est un mutant de la race Wistar chez lequel un gène autosomal, récessif à pénétrance incomplète, est responsable d'une déficience en enzyme UDP glucuronyl-transférase. Celle-ci induit le développement d'une hyperbilirubinémie non conjuguée, chronique, héréditaire, se traduisant par un ictère précoce et grave auquel s'associent une néphropathie et très souvent une encéphalopathie.

b. Historique. [109].

En 1938, C.H. GUNN [45, 46] décrit une mutation dans la souche d'élevage Wistar des Laboratoires CONNAUGHT (Canada) ; ces mutants présentent un ictère.

Bien que le rat Wistar soit considéré aujourd'hui comme un albinos, la souche d'origine possèdait le gène mutant pie que l'on

retrouve chez le rat Gunn ; cependant il n'y a pas de lien entre le gène de l'ictère et ce gène pie (gène "capuchon" car la tête et le cou, ainsi que la ligne du dos sont couverts de poils pigmentés).

MALLOY et LOWENSTEIN (1940) [69] découvrent que l'ictère n'est pas d'origine hémolytique, mais résulte d'une incapacité à excréter la bilirubine.

LATHE et WALKER (1958) [62] démontrent que des portions de foie de rat Gunn et de nouveau -nés humains ne conjuguent pas la bilirubine, ce qui leur fait penser que l'enzyme catalysant le transfert d'acide glucuronique sur la bilirubine (l'UDP glucuronyl-transférase) est déficiente ou absente. Ces observations sont confirmées par d'autres auteurs [5, 90].

La jaunisse apparaît chez les animaux récessifs homozygotes environ 36 heures après la naissance et persiste toute la vie.

ARIAS (1959) [5] découvre que les microsomes du foie des rats Gunn hétérozygotes (Jj) conjuguent la bilirubine à un taux de 40 à 60 % par rapport aux rats homozygotes normaux dominants (JJ) et confirme l'hypothèse de Gunn, à savoir qu'il y a une dominance incomplète du gène régulant la glucurono-conjugaison de la bilirubine.

c. Elevage du rat Gunn.

L'élevage de rats Gunn à l'Université de l'Etat d'Ohio a été constitué en utilisant un système d'accouplement monogame entre des femelles hétérozygotes Jj non ictériques et des mâles ictériques jj. Les accouplements qui auraient permis la reproduction de rats homozygotes dominants JJ n'étaient pas possibles à cause de la difficulté rencontrée pour distinguer les dominants non ictériques JJ des hété-

rozygotes Jj à la naissance. L'accouplement des mâles jj avec des femelles jj donne rarement des produits vivants, de même que le croisement des mâles Jj avec des femelles jj. Nous ne savons pas s'il y a réduction de la fertilité ; cependant une forte mortalité intra-utérine et une forte mortinatalité ont été observées avec les femelles jj.

La mortalité périnatale est élevée [50]. Dans les premières semaines, un grand nombre d'animaux montrent des signes d'ictère nucléaire ; souvent se développent une dermatite de la tête et du cou, des manifestations infectieuses respiratoires. JOHNSON a relevé sur un lot de 145 rats Gunn, 23 décès avant le 21e jour ; parmi les 122 survivants, 68 % développent une symptômatologie d'ictère nucléaire et la moitié d'entre eux ne survivront pas. Finalement 39 rats seulement, soit 26 % des nouveau -nés atteindront l'âge adulte sans séquelles neurologiques.

Selon BILLING [13], l'administration systématique de vitamine A (50 à 100 UI par jour) diminue de manière significative la fréquence des dermatites et des complications respiratoires. Par contre, l'adjonction de riboflavine et de pyridoxine est sans effet. Le maintien et le développement de l'élevage se heurtent aussi à la fréquence des délivrances prématurées et des portées peu nombreuses, ainsi qu'à la stérilité du mâle qui devient nettement plus importante que celle du Wistar lorsque les croisements de rats Gunn n'ont comporté aucun apport de sang nouveau pendant plusieurs générations.

Dans cet élevage, les rats nouveau -nés avaient un poids approximatif de 6 grammes à la naissance. Les courbes de croissance des hétérozygotes et des homozygotes ictériques ont été établies sur

un groupe de 200 rats Gunn (52 mâles jj, 51 mâles Jj, 54 femelles jj et 43 femelles Jj), avec un total de 20 portées. Les nouveau -nés restaient avec leurs parents pendant 21 jours et étaient pesés quotidiennement pendant cette période. Le sevrage avait lieu à 21 jours et les jeunes étaient ensuite pesés chaque semaine jusqu'à 12 semaines.

Résultats : les poids des hétérozygotes et des homozygotes sont identiques à la naissance et jusqu'au sevrage. Les courbes de croissance sont linéaires chez les mâles et les femelles pendant la période d'allaitement et sont exponentielles par la suite. Par contre, les hétérozygotes grandissent plus vite que les homozygotes après le sevrage, avec une différence devenant significative après la 8e semaine. Dans les 100 couples, il y avait 393 jj et 435 Jj à la première portée, avec une moyenne de 8,3 jeunes par portée.

Comme la plupart des rats produits dans cet élevage ont été utilisés pour la recherche toxicologique périnatale, nous avons peu d'information concernant le taux de mortalité chez les vieux animaux ; il semble néanmoins que ce taux de mortalité spontanée des rats ictériques homozygotes soit supérieur à celui des hétérozygotes.

d. Pathologie spontanée [49, 50].

1/ Caractères de l'ictère.

Dès ses premières publications, GUNN avait noté que l'ictère chronique qui frappait les mutants de Wistar observés dans son élevage était lié à une hyperbilirubinémie presque exclusivement indirecte, avec selles colorées et urines claires. Ces faits ont été maintes fois confirmés depuis lors. Ainsi SCHMIDT et coll. [96], par chromatographie, ne retrouvent aucun dérivé de bilirubine conjuguée dans le sérum. De plus, l'urobilinogène fécal est 7 à 8 fois moins élevé que

chez les Wistar ou Sprague-Dawley témoins.

L'hyperbilirubinémie ne semble pas exister chez le fœtus ; elle apparaît 36 heures environ après la naissance du rat ; elle s'accentue pour atteindre en 2 à 3 semaines un sommet situé entre 100 et 200 mg/l de bilirubine puis redescend en un mois pour se stabiliser vers le taux de 70 mg/l de bilirubine. C'est à la phase d'hyperbilirubinémie maximum que peuvent apparaître les signes neurologiques dits d'"ictère nucléaire". Mais à l'âge adulte, il faut noter que le taux de la bilirubinémie varie considérablement suivant la teneur en graisses du régime alimentaire. Aussi n'est-il pas étonnant que les chiffres de bilirubinémie donnés par les différents auteurs soient assez variables. Pour HOUSSET et coll. [50], les 196 dosages faits sur des rats Gunn de 3 à 6 mois, soumis au même régime alimentaire à teneur lipidique faible (3 % de saindoux), ont permis de trouver des bilirubinémies totales échelonnées entre 56 et 232 mg/l et dont plus des 3/4 des bilirubinémies étaient comprises entre 100 et 175 mg/l.

Pour GUNN [46], entre la 3e et la 8e semaine, en même temps qu'apparaissent souvent les signes d'un ictère nucléaire, il existe une anémie modérée avec microcytose, réticulocytose, fragilité globulaire excessive aux solutions salines ; ces anomalies qui ne sont pas influencées par l'ablation de la rate, d'ailleurs hypertrophiée, s'effacent spontanément chez les animaux survivants à l'âge adulte. Depuis ces premières publications, l'absence d'hémolyse a été vérifiée [96]. A l'anémie s'associe souvent une hypoprotidémie.

Depuis GUNN, il est reconnu que l'ictère congénital à bilirubine non conjuguée du rat est une tare récessive, non liée au sexe. Tous les homozygotes sont ictériques, tous les hétérozygotes ont une bilirubinémie normale.

2/ Glucuronoconjugaison de la bilirubine.

Toute une série de travaux ont établi que l'ictère chronique du rat Gunn est la conséquence d'un défaut de glucuronoconjugaison de la bilirubine, sans doute par absence de la glucurono-transférase hépatique. L'absence d'hyperhémolyse a été vérifiée. Ainsi, in vitro, CARBONE et GRODSKY ont montré que la mise en présence de bilirubine et d'homogénats de foie de Gunn ne permet pas de déceler de bilirubine conjuguée. L'absence de glucuronoconjugaison de la bilirubine ne s'explique, ni par un déficit en acide UDP-glucuronique, ni par la présence d'inhibiteurs enzymatiques [96].

De nombreuses expériences menées in vivo, en particulier par RODRIGUEZ-GARAY et coll. [90], SCHMIDT [96] ont établi que chez le rat Gunn :

- le débit biliaire de bilirubine est très faible en comparaison du débit mesuré chez le Wistar ou le Sprague-Dawley;
- la bilirubine présente dans la bile n'est pas conjuguée ;
- la clearance de la bilirubine non conjuguée introduite dans la circulation est beaucoup plus basse que chez les rats normaux ;
- alors que la clearance et l'excrétion dans la bile de la bilirubine conjuguée sont normales.

Plusieurs auteurs ont étudié,in vivo et surtout in vitro, la glucuronoconjugaison par le foie (ou le rein) du rat Gunn de divers corps autres que la bilirubine. Ainsi a-t-on mis en évidence un déficit de la glucuronoconjugaison de l'O-aminophénol, de l'O-aminobenzoate, du menthol, etc..., alors que la conjugaison de l'aniline se fait normalement. Ces résultats permettent de penser que la formation de ces divers glucuronides relève de systèmes enzymatiques différents.

3/ Voies de suppléance du métabolisme de la bilirubine.

Le contraste entre la relative stabilité de la bilirubinémie du rat Gunn adulte et la faible concentration de la bilirubine dans la bile implique l'existence de voies de suppléance du métabolisme de la bilirubine. En utilisant la bilirubine marquée au ^{14}C chez des rats en fistule biliaire, SCHMIDT [97] a pu ainsi mesurer que, en moyenne, on retrouvait :

- 43 % de la radioactivité dans les selles ;
- 51 % dans la bile ;
- 5 % dans les urines.

90 % de la radioactivité biliaire et la totalité de la radioactivité détectée dans les urines, correspondent à des métabolites de la bilirubine ne donnant pas la diazo-réaction. 60 % de la radioactivité fécale est présente sous forme de bilirubine : ce fait, constaté chez un animal en fistule biliaire externe, suggère fortement la possibilité d'un passage de la bilirubine à travers la paroi intestinale dans le sens sang-intestin.

4/ Ictère nucléaire.

Comme il était prévisible, chez un grand nombre de rats Gunn, des signes cliniques d'ictère nucléaire apparaissent vers la 3e ou 4e semaine, c'est-à-dire au moment approximatif de l'hyperbilirubinémie maximum. Lorsque les animaux survivent, ils peuvent garder, à l'âge adulte, des séquelles neurologiques.

L'apparition des signes d'ictère nucléaire est favorisée par les infections, l'hypoprotidémie. Elle peut être déclenchée par l'administration de drogues comme le salicylate de sodium, certains

sulfamides, etc... qui chassent la bilirubine de ses liaisons avec l'albumine plasmatique et favorisent sa fixation dans les tissus. Les examens histologiques et isotopiques ont montré que les dépôts de bilirubine prédominaient dans les masses nucléaires de la base du crâne, qu'il existait un certain parallélisme entre, d'une part l'importance des dépôts pigmentaires et l'intensité des lésions cellulaires en microscopie électronique et, d'autre part, la constatation de troubles cliniques.

5/ Autres constatations.

Mise à part son incapacité à glucuronoconjuguer la bilirubine (et certains autres corps), le foie du rat Gunn a un fonctionnement normal : le passage des produits iodés de contraste dans la bile, la clearance de la BSP et du vert d'indocyanine sont pratiquement identiques chez le Gunn ictérique et chez le Wistar. En microscopie optique, le foie a un aspect normal, sans pigment biliaire décelable. En microscopie électronique, peu d'anomalies sont observées [50] : désorganisation, dispersion et dilatation légère du reticulum granuleux ; développement un peu inhabituel de l'appareil de Golgi.

Par contre, l'examen histologique du rein montre, chez le rat adulte, des dépôts pigmentaires situés dans le tissu interstitiel, au sommet des papilles rénales et qui sont constitués par des dérivés de la bilirubine. Ces dépôts sont responsables d'une nécrose de l'extrémité des papilles rénales.

Le fonctionnement rénal est perturbé : on note une polyurie avec osmolarité urinaire faible, entraînant une hyperosmolarité extracellulaire (cf. p.75 à 78).

ODELL [74] a montré que chez le rat Gunn nouveau-né, les dépôts de bilirubine dans le rein sont très faibles et le fonctionnement rénal est normal : la néphropathie observée chez l'animal adulte n'est donc pas une anomalie héréditaire.

e. Intérêt du rat Gunn pour le chercheur.

Des faits rapportés précédemment, il ressort que le rat Gunn constitue un animal d'expérience d'un grand intérêt pour étudier l'ictère nucléaire et ses conditions d'apparition, la glucuronoconjugaison de la bilirubine et les voies de suppléance du métabolisme pigmentaire lorsque cette conjugaison est en défaut. Mais grâce à l'ictère à bilirubine libre, permanent et stable, dont il est atteint, le rat Gunn a rendu bien d'autres services aux expérimentateurs.

Les travaux expérimentaux utilisant les propriétés biologiques particulières du rat Gunn peuvent être regroupés sous trois rubriques principales :

- étude des facteurs modifiant l'hyperbilirubinémie non conjuguée ;
- expériences utilisant le défaut de glucuronoconjugaison hépatique de la bilirubine et de certains autres corps ;
- essais d'induction enzymatique chez le rat Gunn homozygote et hétérozygote.

1/ Facteurs modifiant l'hyperbilirubinémie non conjuguée.

Dans ce domaine, le rat Gunn constitue un modèle intéressant en pathologie comparée car, étant le seul animal chez lequel l'ictère nucléaire survient spontanément, il a servi de modèle pour l'étude des circonstances d'apparition de cette encéphalopathie chez le nouveau-né humain. JOHNSON et O'DELL [75] ont démontré l'importance de cer-

taines drogues dans l'inhibition de la fixation de la bilirubine sur les protéines sériques : elles augmentent la concentration de bilirubine dans le système nerveux central et prédisposent à l'ictère nucléaire chez le rat Gunn nouveau-né et chez l'enfant prématuré.

Notons que ce rat ictérique sert également de modèle pour la protection de certains groupes humains présentant une affection analogue à la sienne : le syndrome de Crigler-Najjar peut être assimilé au cas du rat Gunn homozygote jj, tandis que le Gunn hétérozygote Jj représente, au moins fonctionnellement, les formes légères et relativement fréquentes d'hyperbilirubinémie associées au syndrome de Gilbert.

Une des originalités du rat Gunn adulte est de réaliser, contrairement à la plupart des ictères du nouveau-né, une hyperbilirubinémie non conjuguée en état d'équilibre. Cette situation est particulièrement favorable à l'étude des facteurs capables de modifier l'hyperbilirubinémie.

z Régime alimentaire.

En utilisant des régimes alimentaires de composition parfaitement définie et constante, HOUSSET et coll. [49, 50] montrent que la bilirubinémie du rat Gunn répond,avec une grande sensibilité, aux variations de la teneur lipidique du régime : plus le régime est pauvre en lipides, plus la bilirubinémie est élevée et inversement. Dans les limites de ces expériences, la nature des lipides, en particulier leur caractère saturé ou insaturé, ne semble pas intervenir.

Il est possible que la teneur du régime en lipides agisse en modifiant la fixation de la bilirubine sur l'albumine par le relais du

taux des acides gras libres du plasma ; en tout cas, cette constatation a une grande importance pratique. Elle commande tout d'abord que toute expérimentation faite sur le rat Gunn soit menée sous un régime alimentaire défini. Elle oblige ensuite à tenir compte de l'influence du jeûne ou de la restriction alimentaire qui accompagnent nécessairement toute manipulation chirurgicale sur l'animal, comme l'administration de produits toxiques. En effet, 24 ou 48 heures de jeûne entraînent une élévation de la bilirubinémie du rat Gunn, d'autant plus importante que le régime alimentaire précédent était plus riche en lipides.

z Cholestyramine et polyvinylpyrrolidone.

L'importance des transferts de bilirubine du système vasculaire vers l'intestin, à travers sa paroi, explique sans doute que chez le rat Gunn, malgré la faiblesse de l'excrétion biliaire de la bilirubine, on puisse obtenir une chute franche de la bilirubinémie par l'administration de cholestyramine. Cette résine est en effet capable de capter, non seulement les acides biliaires, mais aussi la bilirubine.

HOUSSET et coll. [49] vérifient l'efficacité de la cholestyramine : après 7 jours de régime fixe (25 g/j), comportant 5 % de cholestyramine, la bilirubinémie s'abaisse dans tous les cas, la suppression de la résine entraînant constamment, 7 jours plus tard, une remontée franche de la bilirubinémie.

Poursuivant leurs recherches dans ce domaine, cette équipe obtient une chute constante et presque aussi importante de la bilirubinémie du rat Gunn en ajoutant au régime alimentaire 10 % de polyvinylpyrrolidase (PVP). Le mécanisme d'action de la PVP sur la bilirubinémie n'a pas été élucidé.

z Produits modifiant les liaisons albumine-bilirubine non-conjuguée.

Un certain nombre de produits (médicaments, opacifiants biliaires...) sont capables de réduire la bilirubinémie non conjuguée en rompant les liaisons du pigment avec l'albumine plasmatique. La bilirubine ainsi chassée du secteur vasculaire va se fixer dans les tissus et accroît chez l'animal, comme nous l'avons rappelé plus haut, et chez le nouveau-né le risque d'apparition d'un ictère nucléaire. L'étude de ces phénomènes peut être menée in vitro par des expériences de dialyse. Elle peut aussi, in vivo, utiliser le rat Gunn.

Les produits agissant sur les liaisons albumine-bilirubine non conjuguée réduisent spectaculairement la bilirubinémie du rat Gunn. Ce phénomène a été vérifié avec des produits aussi différents que le benzoate de soude, le tolbutamide, l'acétazolamide, la pénicilline, la tétracycline, le chloramphénicol, le para-aminohippurate de sodium, les émulsions lipidiques, le salicylate de sodium, le sulfisonazole, le bunamiodyl et l'adipiodone [49, 50] entre autres.

Ainsi pour ce dernier produit, injecté en intraveineuse rapide à la dose de 150 à 200 mg/100 g, la bilirubinémie tombe en moyenne de 111 mg/l, soit 65 % de la bilirubinémie initiale. La chute atteint son maximum dès la 5e minute ; elle ne se corrige que lentement, en plusieurs jours, pour le salicylate de sodium et le sulfisoxazole.

Ces expériences sur le rat Gunn permettent d'étudier l'action simultanée ou successive de divers produits, l'effet antagoniste des injections d'albumine humaine. Elles constituent une base d'essai rapide pour tester les médicaments avant de les employer chez les enfants exposés au risque d'ictère nucléaire.

Dans le même ordre d'idée, certains auteurs comme CALABRESE [16] encouragent l'utilisation du rat ictérique dans l'étude de la toxicité éventuelle de certains contaminants de l'environnement, tels que les biphenyles polychlorés (BPC). En effet, en attendant d'établir des standards sanitaires concernant les polluants environnants, il est important de considérer les effets de telles substances sur la santé de certains groupes humains réputés "à haut risque" : les composés phénoliques et biphénoliques,tels que les BPC, sont détoxifiés et excrétés par le processus de glucuronidation chez les mammifères, y compris l'homme ; puisque les fœtus, les nouveau -nés et les individus présentant les syndromes de Crigler-Najjar et de Gilbert présentent des déficiences fonctionnelles dans leurs aptitudes à excréter les toxiques par glucuronidation, il a été conclu que ces groupes sont biochimiquement prédisposés à accumuler les BPC.

Bien que le rat Gunn ne permette pas une représentation absolument exacte des groupes humains intéressés, son utilisation peut offrir au chercheur un modèle plus sélectif en ce qui concerne la pathologie de l'environnement.

⁂ Lumière bleue.

Depuis 1958, à la suite de CREMER et coll., plusieurs pédiatres de divers pays ont traité par la photothérapie les ictères à bilirubine non conjuguée du nouveau-né. Les résultats publiés montrent que la bilirubinémie des enfants soumis à la photothérapie est statistiquement plus faible que celle des enfants témoins. Mais l'appréciation reste difficile car l'ictère par "immaturité hépatique" du nouveau-né est passager, spontanément résolutif, sans plateau d'hyperbilirubinémie.

Le rat Gunn, dont l'hyperbilirubinémie est, au contraire,assez

stable permet une évaluation plus sûre de l'action de la lumière bleue. HOUSSET et coll. [49] observent une chute moyenne de la bilirubinémie de 38 % à La 48e heure et de 45 % au 8e jour sur 6 rats complètement rasés, placés à 10 cm de distance d'une batterie de 4 tubes fluorescents (Philips TL 40 watts/18).

Mais si les expériences sur le rat Gunn apportent la preuve irréfutable de la réduction partielle de la bilirubinémie non conjuguée par la photothérapie, deux questions essentielles restent posées : les dérivés de dégradation de la bilirubine sont-ils toxiques pour le système nerveux ? Quelle est la voie d'élimination de ces dérivés ?

2/ Expériences utilisant l'incapacité de glucurono-conjugaison hépatique du rat Gunn.

L'incapacité du rat Gunn à assurer la glucuronoconjugaison hépatique de la bilirubine a été utilisée par plusieurs auteurs pour résoudre des problèmes variés. Nous en donnerons seulement quelques exemples.

C'est ainsi que LESTER et SCHMIDT [64] ont étudié les conditions d'absorption intestinale de la bilirubine glucuronoconjuguée, éliminée par la bile. Ils ont constaté qu'après introduction de bilirubine conjuguée marquée au ^{14}C, dans la lumière intestinale du Gunn, la radioactivité passait dans le plasma et y était retenue alors que la radioactivité biliaire restait pratiquement nulle. Comme le rat excrète normalement dans la bile la bilirubine conjuguée, les auteurs ont pu conclure de l'expérience précédente que la bilirubine conjuguée, introduite dans la lumière digestive, avait subi une hydrolyse la transformant en bilirubine libre au cours de la traversée de la paroi intestinale.

RODRIGUEZ, GARAY et coll. [91, 88, 87, 20, 19] ainsi que NAKAMURA et coll. [73] étudient également l'absorption de la bilirubine par la muqueuse intestinale ainsi que sa conjugaison avec l'acide glucuronique à ce niveau.

Dans d'autres expériences, LESTER et coll. [63] ont examiné comparativement chez le rat Gunn et chez le rat Wistar, l'excrétion biliaire de quatre tétrapyrroles marqués au tritium : la bilirubine, la mésobilirubine, le mésobilirubinogène et l'i-urobiline. Après injection intra-veineuse, les quatre pigments purifiés sont rapidement excrétés dans la bile du Wistar ; les deux derniers sont éliminés aussi vite par le Gunn que par le Wistar sans avoir été modifiés, alors que les deux premiers, qui doivent être glucuronoconjugués pour être excrétés, ne donnent qu'une faible radioactivité dans la bile du Gunn. Ce type d'expérience permet d'aborder le problème des rapports entre la glucuronoconjugaison des pigments biliaires et leur configuration moléculaire spécifique.

D'autres recherches nombreuses ont intéressé la conjugaison, le transport et l'excrétion de la bilirubine, telles que celles de BERNSTEIN et coll. [11] et de RODRIGUEZ-GARAY et coll. [89] qui ont examiné la distribution intrahépatocytaire de la bilirubine marquée au tritium, conjuguée ou non, chez les rats normaux et Gunn.

Le rôle de la glucuronidation dans le transport hépatique de la bilirubine a été décelé par RODRIGUEZ-GARAY [90] qui remarque que les rats Gunn n'excrètent dans la bile que le 1/6e de la bilirubine excrétée par les rats normaux et qu'une très faible quantité de cette bilirubine est sous forme conjuguée.

3/ Expériences d'induction enzymatique.

L'action éventuelle du phénobarbital comme inducteur de la glucuronoconjugaison hépatique de la bilirubine a été l'objet d'études très nombreuses [25, 53, 72, 84, 85, 86, 104].

Chez l'homme, à la suite de YAFFE et coll. [67] on a publié quelques observations d'ictère chronique à bilirubine non conjuguée (non hémolytique) dans lesquelles l'administration de phénobarbital a entraîné une chute franche de la bilirubinémie. On a pu montrer dans certains cas, que la chute de la bilirubinémie s'accompagnait d'une diminution du pool sérique de la bilirubine et de la demi-vie du pigment.

De même, chez la souris et le rat normal, au cours d'expériences de charge en bilirubine non conjuguée, il a été établi qu'après traitement par le phénobarbital la bilirubine disparaissait plus vite du sérum et que le débit biliaire de bilirubine s'accroissait parallèlement. L'interprétation correcte des résultats n'était pas aisée : il était possible, mais non démontré, que le phénobarbital agisse partiellement ou totalement en activant la glucuronoconjugaison de la bilirubine.

L'utilisation du rat Gunn a constitué une voie d'approche intéressante pour ce problème. DE LEON et coll. [25] ont montré que l'administration prolongée de phénobarbital pendant plusieurs semaines ne modifiait pas la bilirubinémie du rat Gunn ictérique. Les recherches de HOUSSET et coll. [49] confirment ce résultat négatif et partant de la constatation que l'activité glucuronyl-transférase dans les homogénats de foie et dans les diverses fractions microsomales n'augmentait pas après quelques jours de phénobarbital, ces auteurs ont pensé qu'il pourrait être utile d'employer dans leur étude non pas

le rat Gunn homozygote, mais le rat Gunn hétérozygote. En effet, si les rats hétérozygotes pour la tare sont constamment dépourvus d'ictère, le pouvoir de glucuronoconjugaison de leur foie est diminué par rapport aux rats normaux (diminution de 40 à 60 %).

HOUSSET et coll. utilisent des circulations croisées (double anastomose carotide-jugulaire) entre, d'une part, un rat Gunn homozygote et, d'autre part, un rat Wistar ou un rat Gunn hétérozygote, ou encore un rat Gunn hétérozygote traité par le phénobarbital (4 mg/100g par jour) administré par voie orale pendant les trois jours qui précèdent l'expérience. La circulation est maintenue en fonctionnement pendant trois heures et la bilirubinémie des deux animaux est régulièrement mesurée.

Les résultats des trois séries de circulations croisées montrent des différences significatives :

- la bilirubinémie du rat Gunn hétérozygote est plus élevée que celle du rat Wistar pendant toute la durée de la circulation croisée avec un rat Gunn homozygote ;

- la bilirubinémie du rat Gunn hétérozygote prétraité par le phénobarbital est plus basse que celle du rat Gunn hétérozygote non soumis au médicament et se rapproche des résultats obtenus chez le rat Wistar.

Ainsi le phénobarbital paraît capable de normaliser l'épuration de la bilirubine non conjuguée introduite chez le rat Gunn hétérozygote.

2° - Pathologie rénale spontanée du rat Gunn.

Nous avons vu que les rats Gunn homozygotes présentent un ictère rapidement après la naissance, dû à une hyperbilirubinémie

non conjuguée, chronique, non hémolytique. L'autopsie révèle une coloration jaune des muqueuses, du tissu adipeux, de la muqueuse de l'intestin grêle, de la papille rénale et enfin chez le jeune animal, des masses centrales du cerveau.

Une complication d'encéphalopathie dûe à la bilirubine se développe sur 50 % des jeunes rats ictériques, alors que tous sans exception présentent une néphropathie de même origine. C'est cette néphropathie qui retiendra notre attention ici, car elle révèle des aspects intéressants du point de vue physiopathologique et anatomopathologique.

a. Physiopathologie : le défaut de concentration urinaire du rat Gunn.

Les rats Gunn homozygotes présentent cliniquement un syndrome polyurie-polydipsie que l'on ne retrouve pas chez les hétérozygotes.

ODELL et NATZSCHKA [75] ont comparé leur capacité à concentrer l'urine lors de privation d'eau, avec celle des hétérozygotes et ont observé que le rat Gunn homozygote est très déficient sur ce point : pendant les six dernières heures de la période de privation de 24 heures, l'écoulement urinaire moyen était de 50 et 149 μl/100 g par heure pour les hétérozygotes et les homozygotes respectivement.

Le grand volume urinaire éliminé s'accompagne d'une perte importante en sodium et en chlore, tandis que le potassium et l'ammonium ne voient pas leur excrétion modifiée. Le sodium éliminé dans l'urine est trois fois plus important que chez les témoins. La perturbation fonctionnelle est donc caractérisée par une déficience dans la réabsorption du sodium, accompagnée d'une perte d'eau con-

comittante, qui peut être également amplifiée par une excrétion excessive d'urée.

L'analyse de la composition du liquide médullaire dans le rein a démontré que le gradient de concentration du sodium entre le cortex et la papille est très faible (30 mEq/l). L'analyse focale des reins a démontré d'autre part que la bilirubine se trouve à une concentration 100 fois plus importante dans la papille que dans le cortex. Enfin, la clearance des ions est plus importante et la réabsorption d'eau plus faible chez les rats homozygotes.

Sur la base de ces observations, les auteurs concluent que l'aptitude imparfaite à concentrer l'urine est le résultat d'une déficience au niveau de la portion ascendante de l'anse de Henlé, probablement due à la très forte concentration en bilirubine de la médullaire et de la papille rénale de ces rats. La bilirubine diminue la capacité de transport de cette portion ascendante et ainsi altère le système de réabsorption "à contre courant" ; l'urine ne peut donc plus être réabsorbée [70, 75]. La bilirubine pourrait interférer avec le transport ionique actif au niveau de l'anse de Henlé, ou bien altérer la perméabilité du segment à l'eau.

Les données in vitro suggèrent que la bilirubine non conjuguée en concentrations comparables à celles mesurées dans la papille des Gunn jj est capable de découpler la phosphorilation oxydative. Par contre, on ne sait pas si la concentration de bilirubine (130 µg/g de tissu) dans la médullaire externe, où se produit un transport actif, est insuffisante pour découpler la phosphorylation oxydative. De plus, MARTINEZ MALDONADO et coll. [70] ont été incapables de démontrer une diminution de la concentration d'ATP dans la médullaire du rat Gunn adulte, suggérant que si la bilirubine interfère avec le trans-

port des ions dans la médullaire rénale, le mécanisme peut très bien ne pas dépendre de l'ATP.

Les études ultérieures de BRANSON, CALL et CRAIG TISHER [17] provoquant une diminution des concentrations sérique et tissulaire de bilirubine conjuguée par l'association photothérapie + cholestyramine, apportent des confirmations et des éléments nouveaux concernant la toxicité de ce pigment :

- comme supposé auparavant, la bilirubine non conjuguée peut être directement impliquée dans le défaut de concentration urinaire, car une réduction prolongée du taux de bilirubine sérique induite chez les jeunes rats Gunn permet une restauration des capacités de concentration de l'urine ;

- le défaut de concentration urinaire est un phénomène partiellement réversible seulement, et parfois même irréversible chez les rats Gunn homozygotes adultes, probablement à cause des lésions secondaires s'installant dans le parenchyme de la médullaire rénale ;

- la déficience est déjà présente chez les jeunes rats Gunn âgés de 21 jours. Ainsi, entre le 21e jour et 3-4 mois de vie survient un dommage irréversible du rein qui progressera lentement, sauf si un traitement visant à réduire le taux de bilirubine sérique et tissulaire est mis en œuvre ;

- enfin, la combinaison d'une photothérapie utilisant la lumière bleue fluorescente et de l'absorption de cholestyramine semble être le moyen le plus efficace connu pour abaisser les concentrations sérique et tissulaire de bilirubine non conjuguée chez les rats Gunn ictériques.

Mais la simple action physiopathologique de la bilirubine au niveau du rein n'est pas suffisante pour expliquer les symptômes rencontrés chez le rat et, en particulier, l'irréversibilité du trouble chez les adultes (malgré le traitement visant à réduire la concentration de bilirubine dans le rein) indique que des lésions définitives se sont installées, lésions qui se révèlent non plus sur le plan biochimique, mais sur le plan anatomopathologique.

b. Etude anatomo-pathologique du rein de rat Gunn.

Les lésions anatomiques et histologiques du rein de rat Gunn homozygote ont été étudiées par plusieurs auteurs [67, 75, 43, 17, 8, 61, 77] qui utilisent chacun une technique histologique particulière, ce qui nous permettra de mettre en place un schéma histopathologique complet, avant d'envisager les corrélations possibles existant entre les altérations morphologiques et fonctionnelles touchant cet organe.

Notons dès à présent que toutes les lésions sont liées à la présence d'une grande concentration de bilirubine qui exerce un effet toxique sur le rein.

1/ Etude autoradiographique : répartition corporelle de la bilirubine marquée chez les rattes Wistar et Gunn en gestation [67].

Des rattes en gestation Wistar et Gunn reçoivent 25 μCi (=1 mg) de bilirubine ^{14}C par voie intraveineuse et sont sacrifiées à intervalles de temps réguliers. On utilise l'autoradiographie de tout le corps afin d'étudier le devenir de la bilirubine chez les rats normaux et les Gunn. De nombreuses taches noir-intense sont visibles sur les autoradiogrammes dans la zone du foie des rats normaux, indiquant une excrétion biliaire de l'isotope administré ; alors que chez les rats Gunn, le foie présente un noircissement plus diffus. Chez les rats normaux,

les intestins contiennent du matériel radio-actif de façon brève après l'injection, tandis que les Gunn ne montrent aucune radio-activité dans la lumière intestinale ; cependant la surface de la muqueuse révèle un noircissement intense, suggérant une excrétion de bilirubine à ce niveau. Normalement, il n'y a pas de radio-activité dans le cerveau ou la moelle épinière, en dehors des vaisseaux ; pourtant un des rats Gunn,qui avait présenté un épisode apnéique immédiatement après l'injection de bilirubine, a montré un dépôt d'isotope dans le cerveau. Les fœtus des rats normaux et Gunn révèlent une plus faible radio-activité que leurs mères.

Enfin, ce qui nous intéresse plus particulièrement ici, le contenu isotopique du cortex rénal est plus important que celui de la médullaire chez tous les animaux. Mais en plus, la papille rénale des rats Gunn contient un très fort taux de radio-activité : dans cette zone se produit une cristallisation de la bilirubine.

2/ Histologie classique.

ODELL et coll. [75] signalent qu'à l'examen post-mortem d'enfants ictériques et de rats Gunn homozygotes, une coloration jaune de la médullaire interne du rein, en particulier de la papille, est visible. Des cristaux de bilirubine sont observés au microscope dans le tissu interstitiel de la médullaire constituant des dépôts jaunes amorphes et cristallins. Les lésions communes trouvées chez les enfants et les rats ictériques consistent en une nécrose cellulaire et une coloration de l'épithélium des tubules.

D'autre part, les reins des rats Gunn adultes révèlent parfois des cicatrices corticales microscopiques (ODELL et coll. dans une de leurs études notent ces lésions pour 4 rats homozygotes sur 6, con-

tre 1 hétérozygote sur 5, ces rats pesant environ 400 g).

ALEXEN [8] ainsi que GOMBA, GARDIOL et GAUTIER [43] ont fait une étude histologique approfondie sur des rats Gunn de tous âges, afin de noter l'évolution des lésions rénales. Chez les rats nouveaux-nés, la pointe de la papille rénale ne montre pas de dépôt de bilirubine au microscope optique dans les coupes congelées ou en paraffine. Chez les animaux âgés de 19 à 21 jours, une coloration pâle homogène ainsi que des cristaux minuscules, biréfringents, jaune-oranger, rhomboïdaux ou en forme d'aiguille, apparaissent dans le tissu interstitiel sous-jacent de l'urothélium dans la pointe de la papille rénale. Les zones à coloration diffuse et les cristaux sont positifs à la réaction de Gmélin et correspondent à un dépôt de bilirubine.

Il est important de noter que dans les coupes en paraffine préparées à l'aide de benzol, la bilirubine est solubilisée et il y a disparition des cristaux qui ne laissent à leur place qu'une faible coloration diffuse [43].

La quantité de dépôt augmente rapidement et chez les animaux de 1 mois, l'urothélium de toute la pointe papillaire est ulcéré. Chez les vieux rats, il pourra même y avoir une nécrose de la pointe avec calcification locale.

L'évolution des lésions peut arbitrairement être divisée en trois stades :

Stade 1 : de minuscules taches de bilirubine apparaissent dans le tissu interstitiel de la pointe papillaire. Simultanément apparaît dans la même zone une lésion évidente des cellules sous forme de fragments cytoplasmiques et nucléaires minuscules dans les cellu-

les épithéliales des canaux collecteurs et de la surface de la pointe papillaire. Ces fragments sont PAS (+) et représentent probablement un mode particulier de mort cellulaire décrit par KERN en 1971 [58].

Les lésions plus avancées de ce stade montrent un dépôt interstitiel de bilirubine plus diffus et une tendance du pigment à souligner la membrane basale de l'anse de Henlé, des canaux collecteurs et des capillaires près de la pointe de la papille. Le pigment paraît déposé dans la membrane basale de l'anse de Henlé. La bilirubine déposée occupe environ 1 % de la surface de coupe longitudinale de la papille. Des modifications dégénératives surviennent dans les cellules interstitielles, l'endothélium capillaire et l'épithélium de l'anse de Henlé, représentant une forme de transition avec le stade 2.

Stade 2 : le dépôt interstitiel de bilirubine est plus dense et légèrement plus important, atteignant environ 2 % de la surface de coupe de la papille, mais reste cependant limité à la pointe papillaire. Le cytoplasme condensé et les fragments nucléaires vus dans le stade 1 sont toujours présents.

La caractéristique principale de ce stade est la disparition des cellules interstitielles, de l'endothélium capillaire et de l'épithélium de l'anse de Henlé dans la zone pigmentée, laissant des espaces arrondis ou allongés au sein d'une charpente de tissu presque acellulaire et pigmentée. Ces espaces contiennent des moulages éosinophiliques, amorphes et occasionnellement des débris cellulaires. Il peut y avoir disparition de l'épithélium de surface de la pointe papillaire. Les tubes collecteurs sont toujours présents et passent presque intacts, à travers la zone pigmentée ; ils présentent seulement une atteinte cellulaire et des modifications suggérant une régénération.

Ce second stade occupe un intervalle de temps relativement court dans l'évolution de la nécrose papillaire.

Stade 3 : il y a nécrose complète de la pointe de la papille qui intéresse tous les éléments, y compris les tubes collecteurs (ce qui distingue ce stade du précédent). La zone de nécrose constitue environ 5 % de la surface de coupe longitudinale de la papille. L'aspect est caractérisé par une pointe papillaire "en lambeaux" colorée par la bilirubine libérée et dans laquelle des débris amorphes et granuleux, éosinophiles et des cellules desquamées dégénérées et nécrotiques peuvent être observés ; parfois des hémorragies focales se produisent.

Une calcification focale survient dans ce tissu nécrotique sous forme d'une bande transversale à la limite proximale de la zone dégénérée. Cette calcification se produit au niveau des membranes basales et dans les cellules nécrosées.

Cette extrémité dégénérée se sépare spontanément du tissu vivant très fréquemment chez les vieux animaux, laissant une papille tronquée qui montre une extrémité en lambeaux, applatie, limitée par la bande calcifiée et contenant de la bilirubine. On peut voir parfois en surface des portions d'épithélium en régénération.

Il y a souvent une infiltration cellulaire au bord ou dans la zone nécrosée, mais elle est d'ordinaire peu importante ; elle consiste en un exsudat de polynucléaires, accompagnés de quelques lymphocytes et macrophages. La production d'un tissu de granulation n'a pas été observée.

Les préparations au PAS montrent une réactivité dans les foyers calcifiés et présentent occasionnellement un épaississement de la membrane basale des tubules juste au dessus de la pointe nécrosée.

Tous les reins de stade 3 présentent des lésions corticales coniques qui apparaissent macroscopiquement comme des zones focales ou géographiques, brunes, en dépression à la surface du cortex. En utilisant des coupes sériées [43], il est possible de prouver que ces aires fibreuses correspondent à celles qui sont draînées par des canaux collecteurs papillaires dilatés (totalement ou partiellement obstrués).

L'analyse histologique des cicatrices montre une dilatation, une atrophie, voire une perte des tubules, un degré variable d'hyalinisation glomérulaire et une fibrose interstitielle avec infiltration lymphocytaire focale secondaire.

La preuve d'une origine vasculaire ou bactérienne des cicatrices n'a pu être établie. Les territoires cicatriciels ont un bord net et le tissu rénal environnant montre par ailleurs une structure histologique pratiquement normale.

D'autre part, on a pu démontrer par microdissection que de nombreux capillaires et/ou anses de Henlé se trouvaient à proximité ou au contact du territoire papillaire détruit. Cette observation suggère que les extrémités des plus larges néphrons sont détruits par le dépôt de bilirubine, ce qui peut constituer également un facteur provoquant la perte du néphron et l'atrophie du cortex rénal.

Enfin, il faut noter que chez les jeunes animaux, des zones localisées d'hydronéphrose sont une découverte quasiment constante dans le cortex.

Toutes ces observations au microscope optique peuvent être reproduites expérimentalement par administration de Vinylamine ou de divers antalgiques (tels que la phénacétine) à des rats. La nécrose papillaire est également observée lors de troubles vasculaires du rein

(thrombose, ligature de la veine rénale, vasoconstriction dûe en particulier à la toxine staphylococcique) et lors de l'emploi abusif d'antalgiques-antipyrétiques chez l'homme [47].

Nos travaux personnels, effectués au Service d'Histologie - Anatomie pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, nous ont permis d'observer la nécrose de l'extrémité papillaire sur un rat Gunn mâle âgé de trois mois. La microphotographie numéro 1, à faible grossissement, montre une lésion au stade 3 avec nécrose et disparition de la pointe papillaire, laissant en place une papille tronquée "en lambeaux". Nous pouvons noter également la dilatation des tubes collecteurs en amont de la lésion.

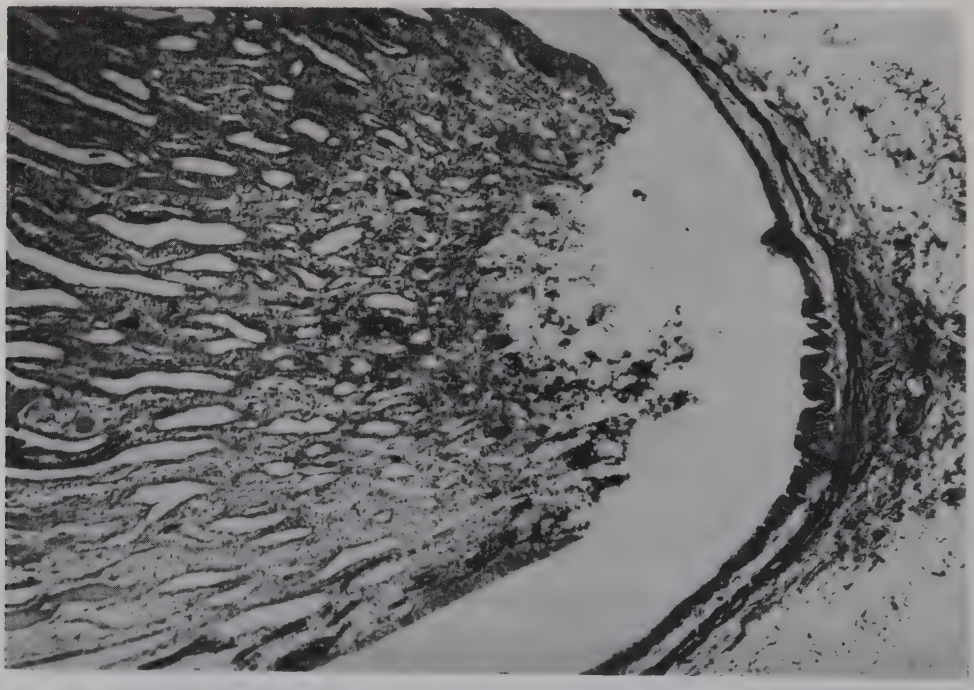

Photo n°1 : Extrémité de la papille rénale d'un rat Gunn de 3 mois (trichrome de Masson - x 25).

Une vue à plus fort grossissement permet de distinguer, à l'extrémité de la papille, des cristaux de bilirubine mêlés à des débris tissulaires nécrotiques et plus ou moins calcifiés (cf. photo n°2).

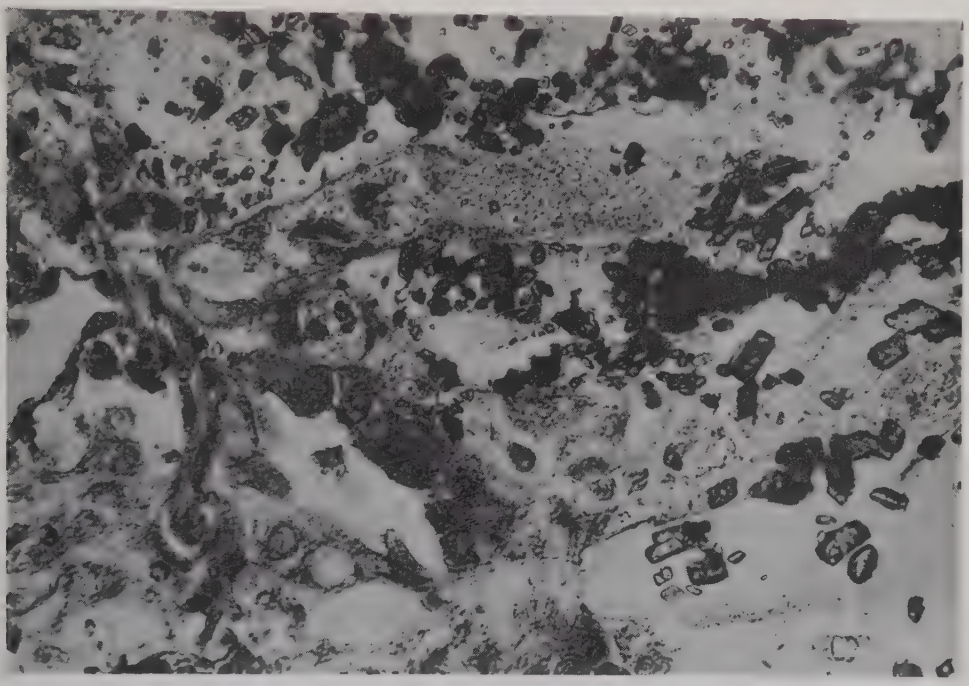

Photo n°2 : Cristaux de bilirubine (réfringents) mêlés à des débris tissulaires plus ou moins calcifiés (noirs) à l'extrémité de la papille rénale (trichrome de Masson - x 100).

3/ Microscopie électronique.

GOMBA, GARDIOL et GAUTIER [43] ont complété leur étude histologique par un examen au microscope électronique et ont observé que les foyers précoces submicroscopiques, de dépôt de bilirubine dans l'interstitium de la papille rénale se présentent à l'électronique sous forme d'agrégats de filaments denses aux électrons. Dans les grands foyers trouvés chez les vieux animaux, le centre devient granuleux, la

masse principale du dépôt étant filamenteuse et granulaire. De temps en temps, il est possible d'observer des espaces transparents aux électrons, plus ou moins polyédriques, dans l'interstitium ; ces espaces correspondent probablement aux cristaux de bilirubine dissous par l'oxyde de propylène lors de la deshydratation et l'inclusion.

Au microscope électronique, le dépôt de bilirubine se révèle invariablement interstitiel et il n'est pas possible d'en trouver en position intracellulaire, intratubulaire ou intravasculaire, bien que macroscopiquement l'ensemble du rein soit jaune (commetous les autres organes du rat Gunn).

LACZKO, GAUTIER et GARDIOL [61] reprennent cette étude électronique en essayant de préciser quelques caractéristiques du pigment bilirubinique non conjugué, accumulé dans la papille rénale du rat Gunn. En effet, ce pigment semble jouir de propriétés particulières :

- sa liposolubilité est nettement inférieure à ce qu'on pourrait attendre : les bains de deshydratation n'en éliminent qu'une faible proportion ;

- sa couleur jaune est très stable dans les matériaux fixés au glutaraldéhyde seul. Aucune transformation en biliverdine spontanée ne se produit, même sur les coupes à congélation soumises à la lumière;

- sa faible colorabilité par les colorants usuels, mais par contre sa forte attirance pour l'acide osmique qui augmente sa colorabilité ;

- l'ultrastructure de ce type de pigment n'est pas identique à celle du pigment bilirubinique rencontré dans le foie humain lors de cholestase et décrit antérieurement par BIAVA (1964) [12]. Les aspects morphologiques différents semblent attribués à la différence de nature des vecteurs associés à la bilirubine au sein du pigment bilirubinique

tissulaire. On peut supposer que le vecteur particulier, et encore inconnu, associé à la bilirubine dans la papille rénale du rat Gunn est responsable de la très grande stabilité du pigment ainsi que des caractères morphologiques ultrastructuraux du pigment. Soulignons cependant qu'aucun caractère ultrastructural ne permet actuellement de préciser si un pigment inconnu contient ou non de la bilirubine.

Par contre, la stabilité de ce pigment et la facilité de son repérage font de la papille du rat Gunn un outil précieux pour l'étude histochimique du pigment bilirubinique. D'une part, l'emploi de coupes semi-fines de matériaux inclus en plastique permet d'obtenir une haute résolution au microscope photonique ; d'autre part, la possibilité d'introduire par diazotation un groupe sulfonique hautement réactif au niveau de la molécule de bilirubine elle-même (LILLIE et PIZZOLATO, 1969) [66] ouvre de nouvelles possibilités de recherche et devrait en particulier faciliter la mise au point de méthodes permettant l'identification ultrastructurale de la bilirubine.

4/ Corrélation entre les altérations fonctionnelles et morphologiques.

Les observations morphologiques suggèrent que le mauvais fonctionnement de l'anse de Henlé n'est pas seul en cause dans la diminution de la capacité de concentration urinaire observée chez le rat Gunn homozygote [43].

Le dépôt de bilirubine dans la pointe de la papille, certainement due aux conditions osmotiques et au pH particuliers à cette zone du rein [75], détruit pratiquement tous les éléments tissulaires nécessaires à la concentration finale de l'urine dans le segment terminal des tubes collecteurs ; donc du point de vue fonctionnel, les gradients électroly-

tiques papillaire et cortico-médullaire sont réduits.

La destruction de l'extrémité des anses de Henlé et des capillaires situés dans le 1/5 - 1/6 distal de la papille ainsi que l'obstruction partielle ou totale de nombreux tubes collecteurs interfèrent également avec le fonctionnement normal du système "à contre-courant" et, de plus, détériorent le gradient électrolytique cortico-médullaire.

Une altération morphologique importante des cellules des anses de Henlé, situées au dessus de la zone de dépôt bilirubinique dans la papille, n'a pas été observée, mais ceci ne dément pas un effet éventuel de la bilirubine circulante sur le métabolisme de ces cellules.

Pour ce qui est des cicatrices corticales, observées chez les vieux rats Gunn, une origine infectieuse et obstructive semble probable, mais les cicatrices ne paraissent pas contribuer de manière significative à l'insuffisance de concentration urinaire.

L'explication la plus probable concernant l'absence de dépôt bilirubinique dans la papille rénale des rats Gunn nouveau-nés repose sur le fait que la structure du rein et sa fonction sont immatures chez ces animaux ; la concentration en électrolytes de l'urine est normale pendant les trois premières semaines de vie extra-utérine (KRECEK et coll., 1962) [60] et l'apparition du dépôt de bilirubine dans la papille coïncide avec la normalisation des capacités de concentration. Ceci suggère à nouveau une relation entre un milieu hypertonique et la précipitation de bilirubine.

La destruction de l'extrémité papillaire interfère également avec la circulation sanguine dans la papille ; c'est probablement l'explication du fait que les rats Gunn sont plus sensibles que les Wistar aux facteurs

induisant une nécrose papillaire, tels que les anti-inflammatoires (aspirine, phénacétine...).

Nous pouvons noter enfin, que le dépôt de bilirubine dans la papille rénale des êtres humains atteints d'hyperbilirubinémie non conjuguée est extrêmement rare et incomparablement moins important que chez le rat Gunn. Ceci est probablement dû au fait que la papille rénale humaine est proportionnellement plus courte que celle du rat, et que la concentration ionique y est normalement plus faible.

-:-:-:-

CONCLUSION

Les anomalies héréditaires ou acquises concernant la formation, la conjugaison ou l'élimination de la bilirubine sont à l'origine de troubles souvent graves chez l'homme et les animaux.

Le rat Gunn, de par son hyperbilirubinémie non conjuguée, permanente et stable, constitue un bon modèle expérimental pour l'étude du métabolisme de la bilirubine, de la glucurono-conjugaison en général et de la toxicité liée à une hyperbilirubinémie.

De plus, sa pathologie rénale spontanée, essentiellement illustrée par une nécrose de l'extrémité papillaire, n'est pas sans rappeler les lésions observées chez l'homme lors de l'intoxication par certains analgésiques - antipyrétiques, ou lors de troubles vasculaires du rein, laissant envisager une nouvelle possibilité d'utilisation de cette lignée de rat.

Ces nombreux avantages du rat Gunn permettent de le considérer aujourd'hui comme un animal de laboratoire à part entière, au même titre que le rat "hypertendu" ou la souris "Nude". Le trouvera-t-on un jour dans les catalogues des fournisseurs d'animaux de laboratoire ?

-:-:-:-

VU : Le professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire
rapporteur

G. VAN HAVERBEKE

VU : Le Directeur de l'Ecole
Vétérinaire

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Professeur R. LAUTIE

VU : Le Président de la thèse

Professeur GUILHEM

Pr André GUILHEM
Laboratoire d'Histologie
Embryologie - Cytologie
FACULTE de MEDECINE
RANGUEIL
133, route de Narbonne
31400 TOULOUSE

VU et PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 2-4-1981
P/LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE Paul SABATIER
et par délégation
LE VICE-PRESIDENT,

Professeur L. LARENG

BIBLIOGRAPHIE

[1] ABOU-EL-MAKAREM (M. M.) & BOCK (K. W.) - UDP-glucuronyltransferase in perfused rat liver and in microsomes. Glucuronidation of bilirubin. Eur. J. Biochem. 1976, 62, 2, 411-416.

[2] ALI (M. A. M.) - Urinary excretion of bilirubin in the bile duct ligated rat. Bilirubin Metab. Int. Symp. London 1966 (Publ. 1967), 245-252.

[3] ALI (M. A. M.) & BILLING (B. H.) - Renal excretion of bilirubin by the rat. Amer. J. Physiol. 1968, 214, 6, 1340-1345.

[4] AOYAGI (T.) & LOWENSTEIN (L. M.) - The effect of bile acids and renal ischemia on renal function. J. Lab. Clin. Med. 1968, 71, 686. In : GOLLAN (J. L.), BILLING (B. H.), HUANG (S. N.)- Br. J. Exp. Pathol. 1976, 57, 5, 571-581.

[5] ARIAS (I. M.) - A defect in microsomal function in non hemolytic acholuric jaundice. J. Histochem. Cytochem. 1959, 7, 250-252.

[6] ARIAS (I. M.), BERNSTEIN (L. H.), TOFFLER (R.), CORNELIUS (C. E.), NOVIKOFF (A.) & ESSNER (E.) - Black liver disease in Corriedale sheep : a new mutation affecting hepatic excretory function. J. Clin. Invest. 1964, 43, 1249. In : GARTNER (L. M.), ARIAS (I. M.) - Ann. N. Y. Acad. Sci. 1968, 151, 833-841.

[7] ARIAS (I. M.), WOLFSON (S.), LUCEY (J. F.) & Mc KAY (R.) - Transient familial neonatal hyperbilirubinemia. J. Clin. Invest. 1965, 44, 1442. In : GARTNER (L. M.), ARIAS (I. M.) - Ann. N. Y. Acad. Sci. 1968, 151, 833-841.

[8] AXELSEN (R. A.) - Spontaneous renal papillary necrosis in the Gunn rat. Pathology 1973, 5, 1, 43-50.

[9] AXELSEN (R.A.) & BURRY (A.F.) - Papillary necrosis in the Gunn rat : rapid induction by analgesics. Pathology 1972, 4, 3, 225-229.

[10] BARNES (S.), GOLLAN (J.L.) & BILLING (B.H.) - The role of tubular reabsorption in the renal excretion of bile acids. Biochem. J. 1977, 166, 1, 65-74.

[11] BERNSTEIN (L.H.), BEN EZZER (J.), GARTNER (L.)& coll. - Hepatic intracellular distribution of tritium-labelled unconjugated and conjugated bilirubin in normal and Gunn rats. J. Clin. Invest. 1966, 45, 1194-1201. In : YEARY (R.A.) & GROTHAUS (R.H.) - Lab. Anim. Sci. 1971, 21, 3, 362-366.

[12] BIAVA (C.) - Studies on cholestasis. The fine structure and morphogenesis of hepatocellular and canalicular bile pigment. Lab. Invest. 1964, 13, 1099-1123. In : LACZKO (J.), GAUTIER (A.) & GARDIOL (D.) - Pathol. Eur. 1972, 7, 1, 71-81.

[13] BILLING (B.) - Communication personnelle. In : HOUSSET (E.), ETIENNE (J.P.), PETITE (J.P.), OUDEA (P.) & OUDEA (M.C.) - Path. Biol. 1967, 15, 9-10, 546-553.

[14] BLANCKAERT (N.), GOLLAN (J.) & SCHMID (R.) - Bilirubin diglucuronide synthesis by a UDP-glucuronic acid-dependent enzyme system in rat liver microsomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979, 76, 4, 2037-2041.

[15] BUNN (H.F.) & JANDL (J.H.) - The renal handling of hemoglobin. II : Catabolism. J. Exp. Med. 1969, 129, 925. In : PIMSTONE (N.R.) - Semin. Hematol. 1972, 9, 1, 31-42.

[16] CALABRESE (E.J.) - Increased sensibility to polychlorinated biphenyls. Am. J. Path. 1978, 91, 2, 405-408.

[17] CALL (N.B.) & TISHER (C.C.) - The urinary concentrating defect in the Gunn strain of rat : role of bilirubin. J. Clin. Invest. 1975, 55, 2, 319-329.

[18] CHOWDHURY (J. R.), JANSEN (P. L. M.), FISCHBERG (E. B.), DANILLER (A.) & ARIAS (I. M.) - Hepatic conversion of bilirubin monoglucuronide to diglucuronide in uridine diphosphate glucuronyl transferase deficient man and rat by bilirubin glucuronoside glucuronosyltransferase. J. Clin. Invest. 1978, 62, 1, 191-196.

[19] CORCHS (J. L.) & RODRIGUEZ GARAY (E. A.) - In vitro studies on bilirubin transport by the small intestine of the rat. Experientia 1970, 26, 8, 858-859.

[20] CORCHS (J. L.), SERRANI (R. E.) &RODRIGUEZ GARAY (E.A.)- Bilirubin uptake in vitro by the rat intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta 1973, 291, 1, 308-314.

[21] CORNELIUS (C. E.), ARIAS (I. M.) & OSBURN (B. I.) - Hepatic pigmentation with photosensitivity : A syndrome in Corriedale sheep resembling Dublin-Johnson syndrome in man. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1965, 146, 709. In : GARTNER (L. M.) & ARIAS (I. M.) - Ann. N. Y. Acad. Sci. 1968, 151, 833-841.

[22] CORNELIUS (C. E.) & GRONWALL (R. R.) - A mutation in Southdown sheep affecting the hepatic uptake of sulfobromophtaleine (BSP), indocyanine green, rose Bengal sodium cholate and phylloerythrin from blood. Federation Proc. 1965, 24, 144. In : GARTNER (L. M.) & ARIAS (I. M.) - Ann. N. Y. Acad. Sci. 1968, 151, 833-841.

[23] CRIGLER (J. F.) & NAJJAR (V. A.) - Congenital familial non hemolytic jaundice with Kernicterus. Pediatrics 1952, 10, 169. In : GARTNER (L. M.) & ARIAS (I. M.) - N. Engl. J. Med. 1969, 280, 24, 1339-1345.

[24] DAY (R. L.) - Amer. J. Dis. Child 1954, 88, 504. In : VOGT (M. T.) & BASFORD (R. E.) - J. Neurochem. 1968, 15, 11, 1313-1320.

[25] DE LEON (A.), GARTNER (L. M.) & ARIAS (I. M.) - The effect of phenobarbital on hyperbilirubinemia in glucuronyl transferase deficient rats. J. Lab. Clin. Med. 1967, 70, 2, 273.

[26] DE SCHEPPER (J.) & VAN DER STOCK (J.) - Increased urinary bilirubin excretion after elevated free plasma haemoglobin levels. Arch. intern. Physiol. Biochem. 1972, 80, 339-348. In : FOLIOT (A.), CHRISTOFOROV (B.) & PETITE (J. P.) - Am. J. Phys. 1975, 229, 2, 340-343.

[27] DE VOS (R.), DE WOLF-PEETERS (C.) & DESMET (V.) - Histochemical changes in rat kidney after bile duct obstruction. Beitr. Pathol. 1972, 145, 4, 315-324.

[28] DUBLIN (I. N.) & JOHNSON (F. B.) - Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells : new clinicopathologic entity with report of 12 cases. Medicine 1954, 33, 155. In : GARTNER (L. M.) & ARIAS (I. M.) - Ann. N. Y. Acad. Sci. 1968, 151, 833-841.

[29] ELIAS (M. M.), COMIN (E. J.), RODRIGUEZ GARAY (E. A.)- Renal clearance of unbound bilirubin in the rat. Clin. Sci. Mol. Med. 1977, 53, 2, 193-196.

[30] ERICSON (J. L. E.) - Transport and digestion of hemoglobin in the proximal tubule. I : Light microscopy and cytochemistry of acid phosphatase. Lab. Invest. 1965, 14, 1. In : PIMSTONE (N. R.) - Semin. Hematol. 1972, 9, 1, 31-42.

[31] ERNSTER (L.) - In : Kernicterus. Sass-Kortsak Ed. University of Toronto 1961, 174. In : VOGT (M. T.) & BASFORD (R. E.) - J. Neurochem. 1968, 15, 11, 1313-1320.

[32] FEVERY (J.), BLANCKAERT (N.) & DE GROOTE (J.) - The importance of bilirubin transferase, glucosyl-transferase and xylosyl-transferase in man and animals. Digestion 1972, 6, 4-5, 261.

[33] FEVERY (J.) - Comparison in different species of biliary bilirubin IXα conjugates with the activities of hepatic and renal bilirubin IXα uridine diphosphate glycosyl-transferases. Biochem. J. 1977, 164, 3, 737-746.

[34] FOLIOT (A.), CHRISTOFOROV (B.), PETITE (J.P.), ETIENNE (J.P.), HOUSSET (E.) & DUBOIS (M.) - Bilirubin UDP-glucuronyl-transferase activity of Wistar rat kidney. Am. J. Phys. 1975, 229, 2, 340-343.

[35] FOLIOT (A.), CHRISTOFOROV (B.), PETITE (J.P.) & PLOUSSARD - Bilirubin glucuronyl-transferase activity of the kidney of the Wistar rat. Demonstration by kidney transplantation from Wistar to Gunn rats. Biol. Gastroenterol. 1973, 6, 4, 321-322. (Reed. 1974).

[36] FRANCO (D.) & BERTHELOT (P.) - Extrahepatic formation of bilirubin monoglucuronide and diglucuronide. Digestion 1972,7, 5-6, 353. (Reed. 1973).

[37] FRANCO (D.), PREAUX (A.), BISMUTH (H.) & BERTHELOT (P.) - Extrahepatic conjugation of bilirubin. Biol. Gastroenterol. 1971, 3, 260.

[38] GARTNER (L.M.) & ARIAS (I.M.) - Pharmacologic and genetic determinants of disorded bilirubin transport and metabolism in the liver. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1968, 151, 833-841.

[39] GARTNER (L.M.) & ARIAS (I.M.) - Formation, transport,metabolism and excretion of bilirubin. N. Engl. J. Med. 1969, 280, 24, 1339-1345.

[40] GOLLAN (J.L.) & BILLING (B.H.) - The renal clearance of bilirubin and bile acids studied in an isolated perfused rat kidney system. Clin. Sci. Mol. Med. 1975, 49, 3, 28.

[41] GOLLAN (J.L.), DALLINGER (K.J.C.) & BILLING (B.H.) - Excretion of conjugated bilirubin in the isolated perfused rat kidney. Clin. Sci. Mol. Med. 1978, 54, 4, 381-390.

[42] GOLLAN (J.L.), BILLING (B.H.) & HUANG (S.N.) - Ultrastructural changes in the isolated rat kidney induced by conjugated bilirubin and bile acids. Br. J. Exp. Pathol. 1976, 57, 5, 571-581.

[43] GOMBA (S.), GARDIOL (D.) & GAUTIER (A.) - Pathomorphology of unconjugated hyperbilirubinemia. I : Bilirubin nephropathy of Gunn rats. Pathol. Eur. 1973, 8, 1, 61-70.

[44] GRODSKY (G.M.), KOLB (H.J.), FANSKA (R.E.) & NEMECHEK (C.) - Effect of age of rat on development of hepatic carries for bilirubin. A possible explanation for physiologic jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. Metab. Clin. Exp. 1970, 19, 3, 246-252.

[45] GUNN (C.H.) - Hereditary acholuric jaundice. J. Hered. 1938, 29, 137-139.

[46] GUNN (C.H.) - Hereditary acholuric jaundice in the rat. Can. Med. Assoc. J. 1944, 50, 230-237.

[47] HAM (K.N.) & TANGE (J.D.) - Some experimental observations relating to the pathogenesis of renal papillary necrosis. Austral. Ann. Med. 1969, 18, 199.

[48] HEIRWEG (K.P.M.) & BARAC (G.) - Urinary bilirubinoïds after intravenous injection of unconjugated bilirubin in dogs. Arch. Intern. Physiol. Biochim. 1970, 78, 590-591.

[49] HOUSSET (E.), ETIENNE (J.P.), PETITE (J.P.) & CHRISTOFOROV (B.) - Intérêt expérimental du rat Gunn, "Les mutants pathologiques chez l'animal". C.N.R.S. 1970, 293-313.

[50] HOUSSET (F.), ETIENNE (J.P.), PETITE (J.P.), OUDEA (P.) & OUDEA (M.C.) - Le rat Gunn, animal d'expérience privilégié. Pathol. Biol. 1967, 15, 9-10, 546-553.

[51] IGA (T.), EATON (D.L.) & KLAASSEN (C.D.) - Uptake of unconjugated bilirubin by isolated rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 1979, 236, 1, C9-C12.

[52] JANSEN (P.L.M.), CHOWDHURY (J.R.), FISCHBERG (E.B.) & ARIAS (I.M.) - Enzymatic conversion of bilirubin monoglucuronide to diglucuronide by rat liver plasma membranes. J. Biol. Chem. 1977, 252, 8, 2710-2716.

[53] JANSEN (P. L. M.)& HENDERSON (P. T.) - Influence of phenobarbital treatment on p-nitrophenol and bilirubin glucuronidation in Wistar rat, Gunn rat and cat. Biochem. Pharmacol. 1972, 21, 18, 2457-2462.

[54] KAMISAKA (Z.), GATMAITAN (Z.), MOORE (C. L.) & ARIAS (I. M.) - Ligandin reverses bilirubin inhibition of liver mitochondrial respiration in vitro. Pediat. Res. 1975, 9, 12, 903-905.

[55] KATOH (R.), KASHIWAMATA (S.) & NIWA (F.) - Studies on cellular toxicity of bilirubin. Effect on the carbohydrate metabolism in the young rat brain. Brain Res. 1975, 83, 1, 81-92.

[56] KATOH (R.) - Studies on cellular toxicity of bilirubin. Effect on brain glycolysis in the young rat. Brain Res. 1976, 113, 2, 339-348.

[57] KEENE (W. R.) & JANDL (J. H.) - The sites of hemoglobin catabolism. Blood 1965, 26, 705.

[58] KERR (J. F. R.) - Shrinkage necrosis. A district mode of cellular death. J. Path. 1971, 105, 13-20.

[59] KIRSCH (R.), FLEISCHNER (G.), KAMISAKA (K.) & ARIAS (I. M.) - Structural and functional studies of ligandin, a major renal organic anion-binding protein. J. Clin. Invest. 1975, 55, 5, 1 009-1 019.

[60] KRECEK (J.) & HELLER (J.) - Neurohypophysis and the regulation of water and electrolyte metabolism in infant mammals. Proc. Intern. Union Physiological Sciences 1962, 1, 53-59. In : GOMBA (S.) , GARDIOL (D.) & GAUTIER (A.) - Pathol. Eur. 1973, 8, 1, 61-70.

[61] LACZKO (J.), GAUTIER (A.) & GARDIOL (D.) - Study of the non conjugated bilirubin pigment. Structure and ultrastructure of the renal papilla of Gunn rats. Pathol. Eur. 1972, 7, 1, 71-81.

[62] LATHE (G.H.) & WALKER (M.) - The synthesis of bilirubin glucuronide in animal and human liver. Biochem. J. 1958, 70, 705-712. In : YEARY (R.A.) & GROTHAUS (R.H.) - Lab. Anim. Sci. 1971, 21, 3, 362-366.

[63] LESTER (R.) & KLEIN (P.D.) - Bile pigment excretion. A comparison of the biliary excretion of bilirubin and bilirubin derivatives. J. Clin. Invest. 1966, 45, 1839. In : HOUSSET (E.), ETIENNE (J.P.), PETITE (J.P.) & CHRISTOFOROV (B.)-Les mutants pathologiques chez l'animal- C.N.R.S. 1970, 293-313.

[64] LESTER (R.) & SCHMIDT (R.) - Intestinal absorption of bile pigments. II : The enterohepatic circulation of bilirubin in the rat. J. Clin. Invest. 1963, 42, 736. In : HOUSSET (E.), ETIENNE (J.P.), PETITE (J.P.) & CHRISTOFOROV (B.) - Les mutants pathologiques chez l'animal- C.N.R.S. 1970, 293-313.

[65] LEVITT (M.), SCHACTER (B.A.), ZIPURSKY (A.) & ISRAELS (L.G.) - The non erythropoïetic component of early bilirubin. J. Clin. Invest. 1968, 47, 6, 1281-1294.

[66] LILLIE (R.D.) & PIZZOLATO (P.) - Histochemical azo-coupling reactions of the pigments of obstructive icterus and of hematoïdin. I : Diazonium salts used. J. Histochem. Cytochem 1969, 17, 738-748. In : LACZKO (J.), GAUTIER (A.) & GARDIOL (D.) - Pathol. Eur. 1972, 7, 1, 71-81.

[67] LUEDERS (D.) - Autoradiography with ^{14}C bilirubin in pregnant normal Wistar rats and Gunn rats with and without phenobarbital or albumin administration. Z. Kinderheilkd. 1973, 116, 1, 57-72. (Reed. 1974).

[68] Mc DONAGH (A.F.) - Photochemistry and photometabolism of bilirubin. J. Opt. Soc. Am. 1974, 64, 4, 357.

[69] MALLOY (H.J.) & LOWENSTEIN (L.) - Hereditary jaundice in the rat. Can. Med. Assoc. J. 1940, 42, 122-125. In : YEARY (R.A.) & GROTHAUS (R.H.) - Lab. Anim. Sci. 1971, 21, 3, 362-366.

[70] MARTINEZ-MALDONADO (M.), SUKI (W.N.) & SCHENKER (S.) - Nature of the urinary concentrating defect in the Gunn strain of rat. Am. J. Physiol. 1969, 216, 1386-1391.

[71] MENKEN (M.) & WEINBACH (E.C.) - Oxidative phosphorylation and respiratory control of brain mitochondria isolated from Kernicteric rats. J. Neurochem. 1967, 14, 2, 189-193.

[72] NAGASAWA (S.) & ROBINSON (S.M.) - Bilirubin metabolism in Gunn rats treated with phenobarbital. Gastroentérol. Jap. 1972, 7, 3-4, 348 (Réed. 1973).

[73] NAKAMURA (N.) - Studies on bile pigment : 2-intestinal absorption of bilirubin sulfate. Okayama Igakkai Zasshi 1978, 90, 5-6, 589-598.

[74] ODELL (G.B.) - The response of jaundiced and non jaundiced weanling rats to thirsting. Pediatr. Res. 1968, 2, 237. In : HOUSSET (E.), ETIENNE (J.P.), PETITE (J.P.) & CHRISTOFOROV (B.) - Les mutants pathologiques chez l'animal. C.N.R.S. 1970, 293-313.

[75] ODELL (G.B.), NATZSCHKA (J.C.) & STOREY (G.N.B.) - Bilirubin nephropathy in the Gunn strain of rat. Amer. J. Physiol. 1967, 212, 4, 931-938.

[76] OKOLICSANYI (L.), MAGNENAT (P.) & FREI (J.) - Deconjugation of bilirubin glucuronide by the liver. Lancet 1968, 7553, 1173-1174.

[77] OKOLICSANYI (L.), VASSANELLI (P.), SCREMIN (S.) & STELLA (G.D.) - Modifications of the biliary excretion of bilirubin glucuronide in rats with porto caval shunt. Role of UDP-glucuronyl transferase. Biomedicine 1973, 19, 6, 253-256.

[78] OKOLICSANYI (L.), VASSANELLI (P.), SCREMIN (S.), STELLA (G.D.) & PELIZZO (M.R.) - Changes in the enzyme UDP-glucuronyl transferase and in bilirubin metabolism in rats after a portocaval shunt operation with and without sodium phenobarbital treatment. Quad. Sclavo. Diagn. Clin. Lab. 1973, 9, 1, 285-291.

[79] OSTROW (J.D.) - Absorption of bile pigments by the gall bladder. J. Clin. Invest. 1967, 46, 2035-2052. In : ELIAS (M.M.), COMIN (E.J.) & RODRIGUEZ GARAY (E.A.) - Clin. Sci. Mol. Med. 1977, 53, 2, 193-196.

[80] PIMSTONE (N.R.) - Renal degradation of hemoglobin. Semin. Hematol. 1972, 9, 1, 31-42.

[81] PIMSTONE (N.R.), ENGEL (P.), SEITZ (P.T.), MARVER (H.S.) & SCHMIDT (R.) - Inductible heme oxygenase in the kidney : A model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism. J. Clin. Invest. 1970, 49, 74. In : PIMSTONE (N.R.) - Semin. Hematol. 1972, 9, 1, 31-42.

[82] PIMSTONE (N.R.), ENGEL (P.), TENHUNEN (R.), SEITZ (P.T.), MARVER (H.S.) & SCHMIDT (R.) - Inductible heme oxygenase in the kidney. A model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism. J. Clin. Invest. 1971, 50, 2042. In : PIMSTONE (N.R.) - Semin. Hematol. 1972, 9, 1, 31-42.

[83] PIMSTONE (N.R.), ENGEL (P.), TENHUNEN (R.), SEITZ (P.T.), MARVER (H.S.) & SCHMIDT (R.) - Further studies of microsomal heme oxygenase. Mecanism for stimulation of enzyme activity and cellular localisation. S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 1971, 17, 169. In : PIMSTONE (N.R.) - Semin. Hematol. 1972, 9, 1, 31-42.

[84] ROBINSON (S.H.) - Increased bilirubin conjugation in heterozygous Gunn rats treated with phenobarbital. Nature 1969, 222, 5197, 990-991.

[85] ROBINSON (S.H.) - Production and excretion of bilirubin in Gunn rats treated with phenobarbital. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1971, 138, 1, 281-284.

[86] ROBINSON (S.H.), YANNONI (C.) & NAGASAWA (S.) - Bilirubin excretion in rats with normal and impaired bilirubin conjugation. Effect of phenobarbital. J. Clin. Invest. 1971, 50, 12, 2606-2613.

[87] RODRIGUEZ GARAY (E.A.), DELROSARIO SPETALE (M.), MORISOLI (L.S.) & BERRA (H.R.) - Uptake from blood and conjugation of bilirubin by the intestinal mucosa of Wistar, Gunn and hepatectomized rats. Experientia 1971, 27, 8, 904-906.

[88] RODRIGUEZ GARAY (E.A.), DEL ROSARIO SPETALE (M.), MORISOLI (L.S.) & RASSERO (J.A.) - In vitro studies on bilirubin conjugation in the liver and the intestinal mucosa of the rat. Medicina (Buenos Aires) 1974, 34, 4, 339-344.

[89] RODRIGUEZ GARAY (E.A.) & DICKSON (E.R.) - Intrahepatic distribution of triated bilirubin in normal and Gunn rats ; subcellular fractionation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1967, 125, 4, 1291-1293.

[90] RODRIGUEZ GARAY (E.A.), FLOCK (E.K.) & OWEN (C.A.)- Composition of bile pigments in the Gunn rat. Am. J. Physiol. 1966, 210, 684-688.

[91] RODRIGUEZ GARAY (E.A.), MORISOLI (L.) & DEL ROSARIO SPETALE (M.) - Increased bilirubin conjugation in the liver and intestinal mucosa of phenobarbital treated rats. Experientia 1972, 28, 8, 944-946.

[92] ROSENFELD (R.S.), ARIAS (I.M.), GARTNER (L.M.), GALLAGHER (T.F.) & HELLMAN (L.) - Pregnane-3α, 20β -diol: an unusual urinary metabolite associated with neonatal jaundice. J. Clin. Endocrin. Metab. 1967, 27, 1705. In:GARTNER (L.M.) & ARIAS (I.M.) - Ann. N.Y.Acad. Sci. 1968, 151, 833-841.

[93] SANCHEZ (E.) & TEPHLY (T.R.) - Activation of hepatic microsomal glucuronyl transferase by bilirubin. Life Sci. 1973, 13, 11, 1483-1490.

[94] SANCHEZ (E.) & TEPHLY (T.R.) - Bilirubin activation of glucuronyl transferase. Pharmacologist 1973, 15, 2, 249.

[95] SCHIFF (L.) & BILLING (B.H.) - Congenital defects in bilirubin metabolism as seen in the adult. Gastroenterol. 1964, 37, 1249. In : GARTNER (L.M.) & ARIAS (I.M.) - Ann. N.Y.Acad. Sci. 1968, 151, 833-841.

[96] SCHMIDT (R.), AXELROD (J.), HAMMAKER (L.) & SWARM (R.L.) - Congenital jaundice in rats due to a defect in glucuronide formation. J. Clin. Invest. 1958, 37, 1123-1130.

[97] SCHMIDT (R.) & HAMMAKER (L.) - Metabolism and disparition of ^{14}C bilirubin in congenital non hemolytic jaundice. J. Clin. Invest. 1963, 42, 1720. In : HOUSSET (E.), ETIENNE (J.P.), PETITE (J.P.) & CHRISTOFOROV (B.) - Les mutants pathologiques chez l'animal. C.N.R.S. 1970, 293-313.

[98] SKAKUN (G.K.) - Post-castration changes of the bile forming function of rat liver. Byull. Eksp. Biol. Med. 1969, 67, 1, 33-35.

[99] STEVENSON (I.H.) & DUTTON (G.J.) - Glucuronide synthesis in kidney and gastrointestinal tract. Biochem. J. 1962, 82, 330-340. In : FOLIOT (A.), CHRISTOFOROV (B.) & PETITE (J.P.) Am. J. Physiol. 1975, 229, 2, 340-343.

[100] STREBEL (L.) & ODELL (G.B.) - Bilirubin UDP glucuronyl transferase in rat liver microsomes genetic variation and maturation. Pediatr. Res. 1971, 5, 548-559.

[101] TENHUNEN (R.) - Method for microassay of microsomal heme oxygenase activity. Ann. Biochem (in press). In : PIMSTONE (N.R.) - Semin. Hematol. 1972, 9, 1, 31-42.

[102] THALER (M.M.) - Substrate induced conjugation of bilirubin in genetically deficient newborn rats. Science 1970, 170, 555.

[103] TOULET (J.) & ALBOT (G.) - La fonction biliaire. Pigments et sels biliaires dans le sang, les urines et les fécès. Foie et voies biliaires, Expansion Scientifique Ed. 1975, 1, 26-42.

[104] VAINIO (H.) & HIETANEN (E.) - Drug metabolism in Gunn rats. Inability to increase bilirubin glucuronidation by phenobarbital treatment. Biochem. Pharmacol. 1974, 23, 24, 3405-3412.

[105] VOGT (M.T.) & BASFORD (R.E.) - The effect of bilirubin on the energy metabolism of brain mitochondria. J. Neurochem. 1968, 15, 11, 1313-1320.

[106] WALTERS (W.J.) & BOWEN (W.R.) - Amer. J. Dis. Child 1957, 93, 21. In : VOGT (M.T.) & BASFORD (R.E.) - J.Neurochem. 1968, 15, 11, 1313-1320.

[107] YAFFE (S.J.), LEVY (G.), MATSUZAWA (T.) & BAILAH (T.)- Enhancement of glucuronide conjugating capacity in a hyperbilirubinemic infant due to apparent enzyme induction by phenobarbital. New. Engl. J. Med. 1966, 275, 1461. In : HOUSSET (E.), ETIENNE (J.P.), PETITE (J.P.) & CHRISTOFOROV(B.) Les mutants pathologiques chez l'animal. C.N.R.S. 1970, 293-313.

[108] YAMAMOTO (T.) - Studies on urinary bilirubin. The excretion of bilirubin into urine from the toad's kidney. Okayama Igakkai Zasshi 1975, 87, 7-8, 645-651 (Reed. 1976).

[109] YEARY (R.A.) & GROTHAUS (R.H.) - The gunn rat as an animal model in comparative medicine. Lab. Anim. Sci. 1971, 21, 3, 362-366.

[110] ZETTERSTRÖM (R.) & ERNSTER (L.) - Nature 1956, 178,1335. In : VOGT (M.T.) & BASFORD (R.E.) - J. Neurochem. 1968,15, 11, 1313-1320.

-:-:-:-